

MICHELE DIETRICH MOURA COSTA

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
6HIS-ADAM23 E CARACTERIZAÇÃO DA SUA INTERAÇÃO COM A
PROTEÍNA PRÍON CELULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana F. Mercadante

**CURITIBA
2007**

*Aos meus pais, João e Sueli, por todo
carinho e apoio, por quem sou e por tudo que
alcancei.*

*Ao meu Orientador Professor Sílvia Zanata,
por me apresentar a esse fantástico mundo
da ciência.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professor Sílvio e professora Adriana, pela confiança, pelos ensinamentos, pela atenção, incentivo e amizade.

À professora Ida Gubert, por me apresentar ao professor Sílvio para que ele me ensinasse alguns ensaios imunológicos (foi aí que tudo começou...).

Aos amigos Tatiana, Cecília, Daniel, pelas divertidas discussões, pela amizade e pelo companheirismo até altas horas da noite durante aqueles experimentos intermináveis.

À Betinha, Luizito e Katya pela amizade, apoio e pela ajuda em vários experimentos.

Às alunas de iniciação Vivi, Wal, Sofia, Mari e Ju, pelas inúmeras ajudas.

Aos amigos e colegas do laboratório de Neurobiologia, em especial Beth, Luiz, Katya, Bia, Helo, Aline, Mônica, Max, Jaque, pelas discussões científicas e não científicas que deixaram os dias mais divertidos.

Aos novos alunos do laboratório que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Aos alunos do laboratório de matriz extracelular, em especial Olga, Kátia e Rafael, pela ajuda e empréstimos.

Ao professor Emanuel Maltempi de Souza pela pronta disposição em sanar dúvidas e pelos empréstimos.

Aos professores Sílvio Sanches Veiga e Edvaldo Trindade pelas idéias e sugestões.

À professora Cecília Hedin pelo acompanhamento no processo de progressão para o doutorado.

À Gislaine pela amizade, carinho e ótima companhia.

À minha avó Lydia (sempre presente) e ao meu avô Martins pelo carinho em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais pelo esforço em me proporcionar uma educação de qualidade.

À minha irmã Dani e ao meu irmão Rafa, pelo carinho, por compreenderem e agüentarem meu mau humor nos dias que antecederam a defesa.

Aos meus priminhos Dudu, Diogo, Douglas, Igor e Pedro e à minha priminha Belinha, que com um simples sorriso tornam meus dias mais felizes e cheios de esperança.

Ao Sérgio pelo amor e compreensão (nos fins de semana em que tive que estudar ou fazer experimentos).

À CAPES, FAPESP e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

A Deus por estar sempre presente, me encorajando mesmo nas horas mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE (ADAM).....	2
1.2 PROTEÍNA PRÍON CELULAR	11
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ϵ HIS-ADAM23... ..	17
3.1.1 Clonagem dos fragmentos gênicos de interesse no vetor pET32	17
3.1.2 Protocolo para mini-expressão da proteína ϵ His-ADAM23	17
3.1.3 Teste de solubilidade	19
3.1.4 Expressão em larga escala	19
3.1.5 Análise da purificação	21
3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS	21
3.2.1 Imunização dos animais.....	21
3.2.2 Análise da resposta imune por <i>immunoblotting</i>	21
3.2.3 Análise da presença da proteína ADAM23 no cérebro de camundongos	22
3.2.4 Análise da presença da proteína ADAM23 em diferentes linhagens celulares por imunofluorescência	23
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ADAM23 E A PROTEÍNA PRÍON CELULAR.....	24
3.3.1 Método de transfecção por cálcio.....	24
3.3.2 Ensaio de <i>pull-down</i> usando ϵ His-ADAM23 imobilizada em resina de Ni-NTA-Agarose	25
3.3.3 Co-imunoprecipitação das proteínas ADAM23 e PrPc	26
3.3.4 Cultura primária de células hipocâmpais de camundongo.....	27
3.3.5 Ensaio de imunofluorescência para dupla marcação.....	27
3.3.6 Ensaio de adesão celular	28
4 RESULTADOS	30
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA PROTEÍNA ADAM23....	30
4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	36
4.3 INTERAÇÃO ADAM23/PRPC	39
5 DISCUSSÃO	48
5.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA PROTEÍNA ADAM23....	48
5.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	51
5.3 INTERAÇÃO ADAM23/ PRPC	52
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM	– <i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
Amp	– ampicilina
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
BSA	– albumina sérica bovina
CNS	– <i>central nervous system</i>
DAPI	– 4', 6-diaminidino-2-phenylindole
E 17/18	– embriões com 17/18 dias de gestação
FITC	– <i>fluorescein isothiocynate</i>
GFP	– <i>green fluorescent protein</i>
GPI	– glicosilfosfatidilinositol
HBSS	– <i>Hank's balanced salt solution</i>
HEPES	– N-[2-hidroxietil]piperazina-N'- [2-etanosulfonato]
IgG	– Imunoglobulina do tipo G
IMAC	– cromatografia de afinidade à metal imobilizado
IPTG	– Isopropil β -D-thiogalactopyranoside
Da	– dalton
LB	– Meio Luria-Bertani
MEM	– <i>Minimum Essential Médium</i>
N-CAM	– molécula de adesão de célula neural
pb	– pares de bases
PBS	– solução salina tamponada com fosfato
PrPc	– Proteína príon celular
PrPsc	– Proteína príon <i>scrapie</i>
RGD	– sequência de aminoácidos arginina, glicina, asparagina
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	– <i>SDS- polycrylamide gel electroforesis</i>
SNC	– sistema nervoso central
TBST	– solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20
Texas Red	– <i>Tetramethylrhodamine</i>
Tris	– Tris (hidroximetil) amino metano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral das ADAMs.....	02
Figura 2 - Estrutura da proteína prion celular (PrPc).....	12
Figura 3 - Padrão de expressão e solubilidade da proteína ₆ His-ADAM23 construção 2.....	31
Figura 4 - Análise das amostras da proteína recombinante ADAM23 (construção 2) após sua purificação por IMAC.....	33
Figura 5 - Análise da expressão de ₆ His-ADAM23 construção 1 após sua purificação por IMAC.....	35
Figura 6 - Monitoramento das etapas de purificação de ₆ His-ADAM23 construção1.....	35
Figura 7 - O soro hiperimune reconhece a proteína ADAM23.....	37
Figura 8 - Anticorpos policlonais reconhecem a proteína ADAM23 presente na membrana celular.....	38
Figura 9 - ADAM23 e PrPc podem ser co-imunoprecipitados.....	40
Figura 10 - ADAM23 recombinante interage especificamente com PrPc recombinante proveniente de transfecção.....	41
Figura 11 - ADAM23 recombinante interage especificamente com PrPc proveniente do tecido nervoso murino.....	42
Figura 12 - A interação ADAM23/PrPc é independente da glicosilação.....	44
Figura 13 - ADAM23 co-localiza com PrPc na membrana plasmática.....	46
Figura 14 - Células SH-SY5Y diminuem a adesão sobre ADAM23 recombinante quando PrPc de suas superfícies é bloqueado usando anticorpos.....	47

RESUMO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, as células precursoras de neurônios migram para seus destinos finais e os axônios fazem conexões com alvos específicos a fim de estabelecer uma correta rede nervosa. Entre uma série de proteínas envolvidas neste fenômeno, moléculas de adesão possuem um papel central na interação célula-matriz e célula-célula. A Disintegrin And Metalloprotease (ADAMs) são proteínas transmembrânicas com atividade proteolítica e adesiva, sendo estas duas propriedades importantes no desenvolvimento do sistema nervoso. ADAM23 é um membro desta família, expressa principalmente no sistema nervoso central e atua na adesão, uma vez que, seu domínio metaloprotease é inativo. Animais deficientes para o gene *adam23* desenvolvem problemas neurológicos tais como tremor e ataxia logo após o nascimento e sobrevivem no máximo duas semanas. Ambas as observações, sugerem a participação de ADAM23 no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel fisiológico desta proteína. Interessados nos possíveis papéis desempenhados por ADAM23 no sistema nervoso, decidimos investigar interações desta proteína com outras moléculas. Sabendo que PrPc é uma proteína de superfície altamente expressa no sistema nervoso central que pode atuar como molécula de adesão, resolvemos investigar a possível interação entre ADAM23 e PrPc. Para que essa interação fosse investigada, primeiramente, foi necessária a produção da proteína 6His-ADAM23 em sistema heterólogo de *E. coli* e sua utilização como antígeno na imunização de animais para a obtenção de anticorpos policlonais. Com auxílio destas ferramentas foi possível caracterizar a interação *in vitro* entre ADAM23 e PrPc. Os ensaios de co-imunoprecipitação e *pull-down* mostraram que ADAM23 interage *in vitro* com PrPc. As análises de imunofluorescência, usando neurônios hipocâmpais, células da linhagem SHSY-5Y e N2A, mostraram que estas duas proteínas co-localizam em regiões da superfície celular. Finalmente, demonstramos que ADAM23 recombinante promove a adesão de neuroblastomas e essa adesão é inibida quando PrPc da superfície celular é bloqueado por anticorpos anti-PrPc. Esses resultados sugerem um novo papel para PrPc na adesão celular mediada por ADAM23.

ABSTRACT

During the development of the nervous system, neurons migrate to final destinations and axons make connections with specific targets in order to establish a functional nervous net. Among the proteins involved with these phenomena, adhesion molecules have a main role in stimulating cell-matrix and cell-cell interactions. A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) transmembrane proteins have metalloprotease and adhesion activities, which are both important to the nervous system development. ADAM23 is an important member of this family predominantly expressed in the central nervous system (CNS) and can act in cell adhesion since it lacks metalloprotease activity. In addition, mice deficient in ADAM23 develop tremor and ataxia and die less than two weeks after birth. These observations suggest that ADAM23 plays a role in the development, maintenance and function of the CNS. However, the physiological role of ADAM23 is still unclear. Interested in ADAM23's roles, we decided to investigate the interactions between ADAM23 and other molecules. Since PrPc is a glycolipid-anchored protein expressed mainly in CNS, which can also act as an adhesion molecule, we decided to investigate the possible interaction between ADAM23 and PrPc. First, it was necessary to produce some tools specific for ADAM23. Recombinant ADAM23 6His tagged was obtained from heterologous system of *E. coli*. This purified protein was used to immunize animals to obtain polyclonal antibodies. With these new reagents, it was possible to characterize the *in vitro* interaction between ADAM23 and PrPc. Co-immunoprecipitation and pull down assays showed that ADAM23 can interact *in vitro* with PrPc. Sub-cellular co-localization of PrPc and ADAM23 was verified in fluorescence analysis of mouse hippocampal neurons, SHSY-5Y and N2A cells using mouse anti-PrPc and rabbit anti-ADAM23 antibodies. Finally, we demonstrated that the recombinant ADAM23 promotes adhesion of neuroblastoma cells and this adhesion is inhibited when PrPc is blocked by anti-PrPc antibody. Taken together, these findings propose a novel role for PrPc in ADAM23-mediated cell adhesion.

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso do embrião e do recém-nato, as células nervosas precursoras devem necessariamente migrar aos seus destinos finais. Os axônios e dendritos navegam para seus alvos a fim de estabelecer uma correta conectividade, que é de absoluta importância para o funcionamento do sistema nervoso. Neurônios de diferentes classes funcionais apresentam características distintas em sua superfície que determinam interações específicas com outras células, especialmente com células gliais, e com componentes da matriz extracelular. Tais interações são de grande importância para direcionar os cones de crescimento neuronais rumo aos seus alvos específicos, criando uma complexa rede funcional. Entre as proteínas envolvidas neste processo, moléculas de adesão possuem um papel central nas interações célula-matriz e célula-célula (KANDEL *et al.*, 2000).

ADAM23 (A Disintegrin And Metalloprotease) (SAGANE *et al.*, 1998) e PrPc (cellular prion protein) (PRUSINER, 1998) são proteínas altamente expressas no sistema nervoso central que podem atuar como moléculas de adesão (CAL *et al.*, 2000; GRANER *et al.*, 2002; MANGÉ *et al.*, 2002). Enquanto ADAM23 é um receptor transmembrana tipo I, PrPc é uma sialoglicoproteína ligada à membrana plasmática por âncora de GPI (glicosilfosfatidil-inositol). Camundongos nocaute para PrPc possuem distúrbios motores e uma diminuição na camada de células de Purkinje do cerebelo (SAKAGUCHI *et al.*, 1996). Interessantemente, animais deficientes para ADAM23 desenvolvem problemas neurológicos tais como tremor e ataxia logo após o nascimento e sobrevivem no máximo duas semanas (MITCHELL *et al.*, 2001). Ambas as observações levam a hipótese de que ADAM23 e PrPc podem atuar de

maneira conjunta para mediar o desenvolvimento, a manutenção e função do sistema nervoso central.

1.1 A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE (ADAM)

ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) são proteínas transmembranas do tipo I que possuem uma estrutura comum que inclui pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio desintegrina, região rica em cisteína, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), domínio transmembrana e cauda citoplasmática (figura 1). Embora estes domínios não sejam similares aos de outras moléculas de superfície com função de adesão ou proteases, os domínios estruturais das ADAMs são similares aos encontrados na família de proteínas solúveis do veneno de cobra, as metaloproteases de veneno de cobra (SVMPs) (WOLFSBERG *et al.*, 1995).

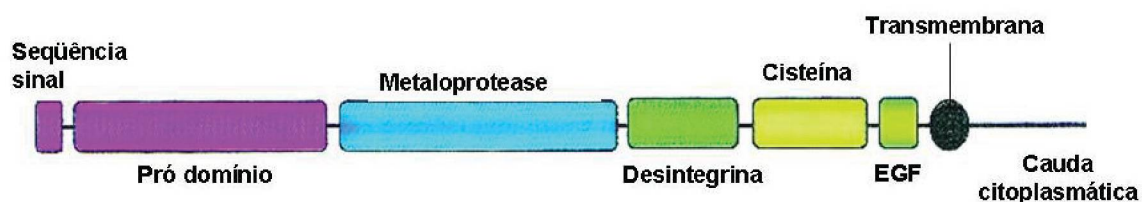


Figura 1: Estrutura geral das ADAMs. Organização dos domínios das proteínas da família ADAM: a parte extracelular contém um pró-domínio N-terminal, seguido do domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, a região rica em cisteína e um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal. Segue-se o domínio transmembrana e a cauda citoplasmática na região C-terminal (adaptado COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

ADAMs são membros da super-família *metzincins*, a qual inclui as metaloproteases de matriz (MMP) e as ADAMs com motivo Trombospondina (ADAMTS). As ADAMs diferem-se das MMPs e das ADAMTSs por apresentarem um domínio de ligação à integrinas e por atuar na clivagem de outras proteínas associadas à membrana (WOLFSBERG *et al.*, 1995).

O pró-domínio mantém o sítio metaloprotease inativo. Em alguns casos, endopeptidases semelhantes à furina podem promover a clivagem do pró-domínio do resto da proteína em um motivo conservado (RxRKR) presente entre o pró-domínio e o domínio metaloprotease. A liberação do pró-domínio e a mudança da coordenação de zinco para o domínio metaloprotease convertem o domínio metaloprotease para um estado cataliticamente ativo (COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

Uma função secundária do pró-domínio é auxiliar chaperonas no dobramento correto das ADAMs, particularmente o dobramento do domínio metaloprotease. Esta hipótese foi sugerida por estudos que mostram que a remoção do pró-domínio da ADAM17 gera uma protease inativa (MILLA *et al.*, 1999), assim como uma construção de ADAM10 sem o pró-domínio é cataliticamente inativa *in vivo* (ANDERS *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que o pró-domínio é necessário não só para inibir a atividade metaloprotease, mas também para promover o dobramento correto das ADAMs (COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

Muitas ADAMs possuem no sítio ativo do domínio metaloprotease a sequência HExxHxxGxxH. A análise estrutural sugere que os 3 resíduos de histidinas ligam-se ao zinco, o de glicina permite uma rotação e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico. O domínio metaloprotease das ADAMs 1, 8 – 10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, 30 e 33-40 contém os resíduos do sítio ativo, e assim, são ativas

cataliticamente. Já as ADAMs 2-7, 11, 14, 22, 23, 29 e 32 possuem seqüências diferentes neste domínio e, apesar de estruturalmente similares, o sítio proteolítico não é ativo (WOLFSBERG *et al.*, 1995; SAGANE *et al.*, 1998; BRACHVOGEL *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2006).

A atividade catalítica das ADAMs tem sido bem caracterizada, sendo bastante importante na liberação de ectodomínios de proteínas de membrana e proteólise da matriz extracelular (BLACK & WHITE, 1998; HOOPER & TURNER, 2000; ALFANDARI *et al.*, 2001; COURTNEIDGE & SEALS, 2003). Um membro desta família que tem sido extensamente estudada em termos de atividade proteolítica é a ADAM17. Esta proteína está envolvida na clivagem de uma ampla variedade de ligantes e receptores, incluindo o fator- α de necrose tumoral (TNF α), a proteína precursora amilóide, o fator de crescimento de transformação- α (TGF α), a proteína Notch, o receptor de crescimento epidermal erB4, entres outras moléculas (BUXBAUM *et al.*, 1998; PESCHON *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2003). Camundongos que possuem o gene de ADAM17 com mutação inativando o domínio metaloprotease apresentam problemas na maturação e organização epitelial, mostrando assim, a importância da atividade proteolítica desta molécula (PESCHON *et al.*, 1998).

O domínio desintegrina deriva da semelhança das desintegrinas de veneno de cobras, podendo apresentar um motivo RGD ou ECD (funcionalmente semelhante ao clássico RGD), ambos com capacidade de ligar várias integrinas (WOLFSBERG *et al.*, 1995; KRÄTZSCHMAR *et al.*, 1996; SAGANE *et al.*, 1998; BIGLER *et al.*, 2000). A interação extracelular com uma integrina pode promover adesão celular através das adesões focais e também pode ativar sinalização intracelular (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999).

O domínio rico em cisteína possui propriedade de adesão, podendo interagir com outros domínios ricos em cisteínas e promovendo assim, fusão de membranas celulares (WOLFSBERG *et al.*, 1995). O domínio semelhante à EGF e os domínios transmembrana e a cauda citoplasmática das ADAMs sugerem que estas moléculas podem servir como transdutores de sinal entre o meio extracelular e intracelular via interações célula-célula e célula-matriz extracelular (WOLFSBERG *et al.*, 1995; KARKKAINEN *et al.*, 2000; COURTNEIDGE & SEALS, 2003; BLOBEL, 2005). O potencial de sinalização das ADAMs ainda não foi explorado, entretanto, sabe-se que a cauda citoplasmática de algumas ADAMs possuem motivos SH3 que podem interagir com outros motivos SH3 presentes em moléculas de sinalização intracelular tais como Grb2 e Src (HUANG *et al.*, 2002; POGHOSYAN *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2006).

Até o momento quarenta (40) proteínas da família ADAM com o domínio transmembrana foram identificadas, sendo que trinta e cinco (35) destas foram clonadas e seqüenciadas¹. Membros desta família têm sido encontrados em espécies de mamíferos, *Caenorhabditis*, *Xenopus* e *Drosophila*, mas nenhuma ADAM foi encontrada em eucariotos unicelulares e em plantas (WOLFSBERG *et al.*, 1995; COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

A expressão das ADAMs pode variar consideravelmente. Em mamíferos muitas ADAMs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29 e 30) são exclusivas ou predominantemente expressas em testículos e/ou associadas a estruturas reprodutivas, estando envolvidas na fertilização e espermatogênese, podendo também atuar em outros órgãos. Algumas ADAMs possuem uma expressão ampla como é o caso da ADAM9/ ADAM10/ ADAM15 e ADAM17, já muitas outras

¹ Table of the ADAMs. Disponível em:
<http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html>. Acessado em: 07/09/2007.

apresentam expressão tecidual específica: ADAM12 e ADAM19 no músculo, ADAM22 no encéfalo e ADAM23 no encéfalo e coração (WOLFSBERG & WHITE, 1996; SAGANE *et al.*, 1998; CERRETTI *et al.*, 1999, BRACHVOGEL *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que dezessete ADAMs são expressas no sistema nervoso central, sendo que algumas delas são expressas principalmente no encéfalo, sugerindo que estas proteínas podem estar relacionadas com o desenvolvimento neural, uma vez que tanto os processos proteolíticos e de adesão celular são essenciais para a manutenção estrutural e funcional do sistema nervoso central (KARKKAINEN *et al.*, 2000, YANG *et al.*, 2006).

Moléculas que orientam a migração neuronal durante o desenvolvimento são dependentes da exposição de ectodomínios, sendo que muitas ADAMs podem atuar na proteólise desta moléculas, atuando indiretamente na migração (ALFANDARI *et al.*, 1997; ALFANDARI *et al.*, 2001). Além disso, muitas moléculas que regulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células nervosas durante o desenvolvimento do sistema nervoso requerem processamento proteolítico, que pode ser mediado por algumas ADAMs (LIEBER *et al.*, 2002; SHIRAKABE *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2004).

O papel das ADAMs no sistema nervoso ainda não está bem esclarecido, embora alguns membros tem sido bastante estudados, como é o caso da ADAM13 de *Xenopus laevis*. Esta ADAM promove a migração de células da crista neural através da remodelagem da matriz extracelular, bem como pela interação com $\beta 1$ integrinas (ALFANDARI *et al.*, 1997; ALFANDARI *et al.*, 2001). Outros membros que parecem ser bastante importantes no desenvolvimento do sistema nervoso, como a ADAM22 e ADAM23, ainda precisam ser melhor estudados.

A importância de ADAM23 no desenvolvimento do sistema nervoso foi mostrada através da análise de camundongos nocaute para o gene *adam23*, que desenvolvem problemas neurológicos tais como tremor e ataxia logo após o nascimento e sobrevivem no máximo duas semanas (MITCHELL *et al.*, 2001).

ADAM23 (também denominada MCD3) é um membro da família ADAM expressa principalmente no sistema nervoso central, presente tanto em encéfalo adulto quanto fetal. Esta ADAM apresenta estrutura típica dos membros da família, no entanto, não possui no seu domínio metaloprotease os aminoácidos que formam o sítio ativo para a ligação de zinco (HExxHxxGxxH), o qual é crítico para a atividade proteolítica. Portanto, ADAM23 é uma molécula potencialmente adesiva, mas não proteolítica e, provavelmente, possui um papel importante no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SAGANE *et al.*, 1998).

Foi demonstrado que o domínio desintegrina de ADAM23 proveniente da expressão heteróloga em *E. coli* pode promover a adesão de neuroblastomas (NB100 e SH-Sy5y) e de astrocitomas (U373 e U87 MG) (CAL *et al.*, 2000).

A análise da interação com integrinas mostrou que ADAM23 interage especificamente com integrina $\alpha v \beta 3$ para promover a adesão celular. Uma maior adesão celular foi observada quando células que expressam funcionalmente a integrina $\alpha v \beta 3$ ($\beta 3$ -CHO -chinese hamster ovary) são semeadas sobre poços recobertos com o domínio desintegrina de ADAM23. No entanto, tal adesão não foi observada para células CHO que expressam $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$ e $\alpha v \beta 1$ submetidas ao mesmo procedimento que células que expressam $\alpha v \beta 3$. Esta interação entre ADAM23 e $\alpha v \beta 3$ foi confirmada ao bloquear a integrina usando um anticorpo monoclonal anti- $\alpha v \beta 3$. Foi verificado que a adesão da linhagem $\beta 3$ -CHO sobre ADAM23 é diminuída substancialmente na presença do anticorpo anti- $\alpha v \beta 3$.

(CAL *et al.*, 2000). Interessantemente, $\alpha v\beta 3$ é abundantemente expressa nas células gliais radiais durante o desenvolvimento de camundongos (HIRSCH *et al.*, 1994). Sabendo que eventos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular são de grande importância para a formação da rede neural (SCHMID & ANTON, 2003), pode ser que alguns destes eventos estejam sendo modulados pela ADAM23, que interage especificamente com $\alpha v\beta 3$ (CAL *et al.*, 2000).

O processo de interação específica entre $\alpha v\beta 3$ e ADAM23 é mediado por uma pequena seqüência de aminoácidos (AVNECDIT) na alça da desintegrina ADAM23. Neste aspecto, a interação $\alpha v\beta 3$ /ADAM23 mostrou-se independente da presença do motivo RGD (CAL *et al.*, 2000). O motivo RGD tem sido descrito a pelo menos duas décadas como o principal domínio de reconhecimento pelas integrinas e presente nas moléculas de matriz extracelular (RUOSLAHTI, 2003).

O gene *Adam23* humano foi mapeado no cromossomo 2q33 e o gene de camundongo na região central do cromossomo 1, mostrando que este gene ocupa um único *locus* (SAGANE *et al.*, 1999). No entanto, esta proteína apresenta três isoformas que são transcritos variantes do mesmo gene e que também são expressas no encéfalo predominantemente e no coração. Estas isoformas são ADAM23, também designada de ADAM23 α (SAGANE *et al.*, 1998), ADAM23 β e ADAM23 γ (SUN *et al.*, 2004). ADAM23 β e ADAM23 γ possuem produtos de transcritos diferentes de éxons, mas provenientes do mesmo *locus* de ADAM23. ADAM23 β difere-se de ADAM23 em alguns dos aminoácidos que formam o domínio transmembrana (TM), compartilhando 54% (13/24aa) de similaridade no TM. ADAM23 γ difere-se de ADAM23 pela ausência do domínio transmembrana e com relação expressão temporal, pois ADAM23 γ é expressa principalmente em cérebros de embriões e neonatais, excedendo a expressão de ADAM23 e ADAM23 β , tendo

uma diminuição na sua expressão após o nascimento. Este perfil de expressão de ADAM23 γ condiz com o estágio de formação da rede neural, sugerindo que esta isoforma pode ter um papel importante nesta etapa de desenvolvimento (SUN *et al.*, 2004).

Com relação à localização de ADAM23 no cérebro, foi mostrada a presença de altos níveis nas áreas CA1/CA3 do hipocampo e nos neurônios piramidais dos giros denteados. No cerebelo sua expressão concentra-se nas células de Purkinje e nas células granulares cerebelares (CGC) (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Nas diferentes regiões do cérebro (tronco cerebral, cerebelo e córtex) foi verificada a expressão de um antígeno de 70 kDa correspondente a ADAM23, através da comparação com amostras provenientes de animal *Adam23* nocaute (MITCHELL *et al.*, 2001). Entretanto, células granulares cerebelares expressam uma outra forma de ADAM23, que possui massa de aproximadamente 100 kDa, designada de forma imatura. Essas duas formas da proteína ADAM23 podem ser explicadas pelo processamento do seu pró-domínio por endopeptidases, sendo a forma imatura (100 kDa) não processada e, a forma madura (70 kDa) processada e na qual falta o pró-domínio (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Este processo de clivagem do pró-domínio do resto da proteína ocorre normalmente nas ADAMs e parece ser pré requisito para gerar a atividade metaloprotease (COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

ADAM23 imatura e madura são proteínas glicosiladas e que estão presentes na superfície celular, sendo que a forma imatura está em menor quantidade. Foi descrito para outros membros da família das ADAMs a existência de formas imatura e madura, sendo a última resultado do processamento por endopeptidases (GOLDSMITH *et al.*, 2004).

Recentemente foi mostrado que ADAM23 possui papel importante na diferenciação de células P19 (linhagem celular de carcinoma embrional) em neurônios bem como na formação de neuritos (SUN *et al.*, 2007). Sabendo que ADAM23 é um ligante potencial da integrina $\alpha v\beta 3$, e que integrinas possuem um importante papel no desenvolvimento através da transdução de sinais, é possível que a indução neural promovida por ADAM23 seja dependente da interação com $\alpha v\beta 3$ (CAL *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2007).

Com base nessas informações descritas na literatura, é possível inferir que ADAM23 possua um importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso, mas que ainda precisa ser investigado. O estudo de interações protéicas que possam revelar outros parceiros moleculares vem a ser um passo importante para o melhor entendimento da função desta proteína. Os resultados reportados por Schmitt-Ulms e colaboradores (2004) sugerem que ADAM23 é um possível ligante de PrPc, uma outra proteína que também é foco de estudo do nosso laboratório. Assim, surgiu o interesse de estudar a possível interação entre essas duas proteínas, ambas abundantemente expressas no SNC. Entretanto, não há reagentes disponíveis que permitam o estudo da proteína ADAM23, sendo necessário a produção de ferramentas que permitam tal estudo. Levando em conta os interesses do nosso laboratório, decidimos então produzir essas bioferramentas (proteína recombinante ADAM23 e anticorpos policlonais). Tais reagentes foram fundamentais para a realização da caracterização da interação ADAM23/PrPc apresentada neste trabalho.

1.2 PROTEÍNA PRÍON CELULAR

A proteína príon celular é uma sialoglicoproteína localizada na superfície da célula via âncora de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) expressa em muitos tecidos, mas em particular no sistema nervoso central (PRUSINER, 1998; PRUSINER *et al.*, 1998). A forma madura do PrPc estende-se do resíduo 23 aos 231, uma vez que a sequência sinal para direcionamento ao retículo endoplasmático (resíduos 1-22) e o peptídeo sinal para adição da âncora de GPI (resíduos 232-253) são clivados antes da proteína chegar a superfície celular. A proteína possui um domínio amino-terminal (N-terminal) com quatro cópias repetidas de um octapeptídeo PHGG (G/S) WGQ, um domínio central hidrofóbico (resíduos 106-126 com propriedades neurotóxicas) e uma região carboxi-terminal (C-terminal) contendo dois sítios de N-glicosilação (via asparagina - Asn). Uma ponte dissulfeto liga duas regiões da proteína que formam estruturas alfa hélices helicoidais (PRUSINER, 1998; PRUSINER *et al.*, 1998).

PrPc pode ser clivado, sendo que o seu processamento normal no cérebro incluem a proteólise entre os resíduos 106-126, promovendo a formação de um fragmento N-terminal solúvel e a geração de um fragmento associado a membrana chamado C1 (fragmento C-terminal ligado a membrana via GPI) (CHEN *et al.*, 1995). Foi descrita a participação direta de duas desintegrinas, ADAM10 e ADAM17 (TACE), na clivagem normal do PrPc (VICENT *et al.*, 2001; LAFFONT-PROUST *et al.*, 2005), bem como a participação indireta da ADAM9, pela modulação que esta exerce sobre ADAM10 (CISSÉ *et al.*, 2005).

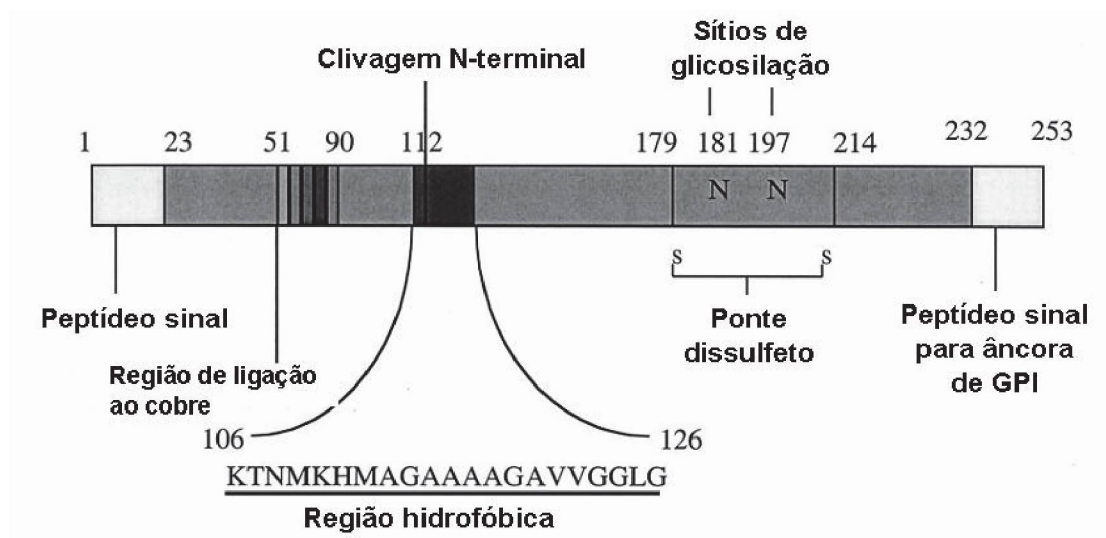


Figura 2: Estrutura da proteína prion celular (PrPc). A proteína é ancorada à membrana celular por uma âncora de GPI. A sequência sinal para direcionamento à membrana plasmática e o peptídeo sinal para GPI são clivados antes da proteína chegar à superfície celular. A forma madura estende-se do resíduo 23 ao 231, contendo uma região repetitiva de uma sequência octamérica, na qual podem ligar íons cobre; uma região hidrofóbica na qual a molécula pode ser clivada e dois sítios de N-glicosilação. Uma ponte dissulfeto promove a formação da estrutura tridimensional da proteína (adaptado BROWN, 2001).

Alterações no metabolismo da proteína prion celular (PrPc) pode levar a uma forma resistente a ação de proteases, insolúvel em detergentes e com tendência a agregação, denominada PrPsc (scrapie) que também é ligada à membrana via âncora de GPI (PRUSINER, 1998). Esta isoforma anormal não é proveniente de processamento alternativo de mRNA, uma vez que a proteína prion celular é codificada a partir de uma única sequência aberta de leitura localizada em um único éxon. Enquanto a sequência primária da forma normal e da *scrapie* é a mesma, há uma grande diferença nas estruturas secundárias. PrPc é constituído predominantemente por α -hélices, enquanto que, PrPsc é rico em regiões constituídas por folhas β -pregueadas (revisado por PRUSINER, 1998).

PrPsc é o agente responsável pelas doenças priônicas. Essas doenças, também são conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE) que acometem tanto animais domésticos quanto animais selvagens. Em humanos já foram descritas várias formas de doenças priônicas tais como o Kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), a síndrome de Gerstmann-Sträussle-Scheinker (SS) e a Insônia Familiar Fatal (PRUSINER, 1998). Essas são caracterizadas por vacuolização e morte neural, astrogliose e deposição de agregados protéicos (CHESEBRO, 1998).

Com relação ao papel fisiológico de PrPc, foram realizadas investigações através do estudo de animais nocaute para o gene do PrPc. Sakagushi e colaboradores (1996) mostraram que animais nocaute apresentam distúrbios motores e diminuição acentuada das células de Purkinje no cerebelo. Uma outra construção de nocaute para PrPc foi feita por Büller e colaboradores (1992), e os animais se desenvolveram sem apresentar alteração fenotípica significativa. No entanto, testes comportamentais mostraram que esses animais nocautes são mais sensíveis a drogas indutoras de distúrbios epiléticos e possuem atividade locomotora alterada (WALZ *et al.*, 1999; ROESLER *et al.*, 1999).

Uma série de evidências dá suporte à hipótese de que PrPc está envolvido no metabolismo do cobre. Esta proteína pode-se ligar ao cobre através de múltiplas repetições octaméricas em sua porção N-terminal que poderia estar relacionado às respostas celulares ao estresse oxidativo (BROWN *et al.*, 1997; CUI *et al.*, 2003). Animais deficientes em PrPc apresentam uma diminuição de cobre no cérebro e uma menor atividade superóxido dismutase em relação aos animais normais (revisado por BROWN, 2001).

Outras funções para a proteína príon celular têm sido identificadas através da sua interação com outras moléculas. Pela associação com a proteína STI1 (Stress Inducible Protein-1), PrPc promove a ativação de mecanismos neuroprotetores (via cAMP/PKA) em neurônios de retina que foram induzidos a apoptose por inibidores de síntese protéica (ZANATA *et al.*, 2002, CHIARINI *et al.*, 2002). Recentemente foi mostrado que a interação destas duas proteínas (PrPc/STI1) promove a neuritogênese pela ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e neuroproteção pela ativação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) em neurônios hipocampais (LOPES *et al.*, 2005).

Outros dados indicam que a interação de PrPc e N-CAM promove neuritogênese através da ativação de Fyn (SANTUCCIONE *et al.*, 2005).

O potencial adesivo de PrPc foi demonstrado em células de neuroblastoma (N2a) que super-expressam PrPc. Essas células apresentam uma alta taxa de agregação quando comparadas com células normais, sendo que esta agregação é inibida por anticorpos anti-PrPc e também quando as células são tratadas com uma enzima que promove a liberação de moléculas ancoradas à membrana via GPI (enzima PIPLC). Esses resultados mostram que a agregação é em grande parte mediada pela ligação transcelular de PrPc à alguma molécula receptora ainda desconhecida (MANGÈ *et al.*, 2002). Além disso, foi descrito que PrPc é um receptor para laminina e esta interação é importante para a adesão neuronal e para a extensão e manutenção de neuritos em culturas de células da linhagem PC12 e neurônio hipocampais (GRANER *et al.*, 2000).

Com relação à interação com proteínas de matriz, além da laminina, PrPc também liga vitronectina (Vn), mas não liga fibronectina e nem colágeno tipo IV. A interação PrPc/Vn promove o crescimento axonal em neurônios provenientes da raiz

do gânglio dorsal. Entretanto, crescimento axonal promovido pela vitronectina continua sendo observado neste mesmo tipo celular proveniente de animais nocaute para PrPc, resultado que pode ser explicado pelo aumento da atividade da integrina $\alpha\beta3$ nesses neurônios (HAJJ *et al.*, 2007).

Dados reportados por SCHMITT-ULMS e colaboradores (2004) demonstram que muitas proteínas envolvidas na adesão celular e em neuritogênese estão presentes nas mesmas regiões especializadas de membrana nas quais PrPc é expresso (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004). Dentre estas moléculas foi identificada a proteína ADAM23, entretanto nenhuma interação entre ADAM23 e PrPc havia sido demonstrada. No presente trabalho a interação *in vitro* ADAM23/PrPc foi caracterizada.

2 OBJETIVOS

1. Expressar a proteína ADAM23 em sistema heterólogo recombinante de *E. coli* e purificar por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC).
2. Produzir anticorpos policlonais anti-ADAM23.
3. Utilizar os reagentes obtidos em ensaios bioquímicos e de localização tecidual da proteína ADAM23.
4. Identificar a interação *in vitro* de ADAM23 e PrPc.
5. Avaliar o papel na adesão celular desta possível interação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ϵ HIS-ADAM23

3.1.1 Clonagem dos fragmentos gênicos de interesse no vetor pET32

Um fragmento de DNA de 873 pares de bases correspondentes a sequência codificadora dos domínios desintegrina e metaloprotease (construção 1, aa 297-589) da ADAM23 murina e um fragmento de 1203 pares de bases contendo a sequência codificadora dos domínios supracitados e mais o pró domínio (construção 2, aa 155-557) foram obtidos por meio de PCR (polimerase chain reaction), a partir de cDNA de cérebro de camundongo. Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram forward 5'-GGGGTACCTATTTGGAGCTTATGATTGTT-3' e reverse 5'-CCCAAGCTTTCAATAGCCATCTTGTTTATG-3' para a construção 1 e, forward 5'-GGGGTACCGGCTCCAAGTTCATTCTT-3' e reverse 5'-CCCAAGCTTTCATTCATACCCTCGTGACTG-3' para a construção 2. Os fragmentos amplificados foram clivados com as endonucleases de restrição *HindIII* e *KpnI* e clonados no vetor pET32a (Novagen, San Diego, CA).

Uma figura representativa mostrando os domínios da proteína presentes em cada construção encontra-se em anexo (anexo 1) assim como a figura do vetor de expressão usado neste trabalho (anexo 2).

3.1.2 Protocolo para mini-expressão da proteína ϵ His-ADAM23

A produção de proteínas recombinantes em sistema heterólogo de *E. coli* foi realizada como descrito por Sambrook *et al.* (2001), a partir da introdução do plasmídeo pET32-Adam23 na estirpe de *E. coli* BL 21 (DE3) (Novagen Co.).

Bactérias eletrocompetentes (SAMBROOK *et al.*, 2001) foram eletrotransformadas com aproximadamente 25 ng do plasmídeo de interesse (pET32-*Adam23*). Para recuperação, as células foram incubadas durante 1 hora em 1 ml de meio LB (1% NaCl, 0,5% extrato de levedura, 1% peptona, pH 7,0) a 37° C. Após este tempo, a cultura foi plaqueada em meio sólido (LB-Ágar 17g/l ágar) contendo antibiótico apropriado (ampicilina) na concentração de 100 µg/ml (o plasmídeo pET32 possui um gene que codifica resistência a ampicilina, por isso, as células, após a transformação, são cultivadas em meio LB-Ágar contendo o antibiótico ampicilina).

Colônias transformantes foram inoculadas em 2 ml de meio LB/Amp e cultivadas durante 16 horas a 37 °C. Esta cultura saturada foi diluída 1:50 em 10 ml de meio LB/Amp para posterior crescimento a 37° C sob agitação constante. Ao atingir a absorbância de 0,6 a 600 nm, foi adicionado IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) na concentração final de 0,4 mM para a indução da expressão da proteína recombinante. Então, a cultura foi incubada a 37°C por mais quatro horas. Uma alíquota de 2 ml de cada cultura foi coletada e centrifugada a 4000 xg por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 100 µl tampão de amostra redutor duas vezes concentrado (62 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% de SDS, 40% glicerol, 0,2% azul de bromofenol e 200 mM β-mercaptoetanol) e 20 µl de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE 10% (SAMBROOK *et al.*, 2001) e o gel corado com azul de Coomassie para verificação das colônias de alta expressão.

3.1.3 Teste de solubilidade

Para testar a solubilidade da proteína recombinante ADAM23 expressa pelas colônias da cepa BL21 (DE3), repetiu-se o procedimento descrito no item 3.1.2 utilizando 200 ml de cultura bacteriana.

Após a indução, as culturas foram centrifugadas a 4.000 xg por 10 minutos a 4°C. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 10 ml de tampão de lise nativa (500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de imidazol). A suspensão celular foi submetida à diferença de pressão em prensa de French para que ocorresse a lise mecânica das células, e o extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (12000 xg por 20 minutos à 4°C). Após a lise, uma alíquota de 30 µl deste sobrenadante (fração solúvel) foi reservada para análise em SDS-PAGE. O sedimento resultante da centrifugação foi solubilizado com 5 ml de tampão de lise desnaturante (8 M Uréia, 500 mM NaCl e 50 mM de Tris-HCl pH 8,0), centrifugado novamente, e uma alíquota de 30 µl deste sobrenadante (fração insolúvel) foi analisada por SDS-PAGE 10%.

Este procedimento foi repetido utilizando uma temperatura menor de cultivo (22°C) e outros agentes solubilizadores (N-lauril-sarcosil, Tween-20, Triton X-100 e NP40, todos na concentração de 0,5%) adicionados ao tampão de lise.

3.1.4 Expressão em larga escala

Clones com alta taxa de expressão da proteína ADAM23 foram cultivados em 1000 ml de meio de cultura líquido, com agitação, a 37°C. Quando as culturas atingiram a absorbância de 0,6 a 600 nm, foram induzidas à expressão utilizando 0,4

mM de IPTG e a cultura foi incubada por mais quatro horas. O meio de cultura foi centrifugado e o sedimento celular foi utilizado para a purificação.

O precipitado foi ressuspenso em 20 ml solução de lise desnaturante (8 M uréia, 500 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl pH 8,0) e submetido à pressão física em prensa de French. O extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (12000 xg por 20 minutos à 4°C) e o sobrenadante foi então submetido à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). A proteína recombinante ϵ His-ADAM23 ligou à fase estacionária Ni-NTA-Agarose (Qiagen GmbH, Alemanha) através de ligação de coordenação do cátion Ni^{2+} imobilizado. A resina foi empacotada em uma coluna (feita com seringa de 5 ml) e lavada com tampão de lise desnaturante contendo 10 mM de imidazol, para que proteínas fracamente ligadas, por possuírem histidinas seqüenciais, se desligassem da coluna e diminuíssem a contaminação da proteína de interesse. As proteínas foram então eluídas com 500 mM de imidazol em tampão de lise e posteriormente dialisadas contra PBS para remoção do agente caotrópico. Foram feitas três trocas de dois litros (seis litros no total) do tampão de diálise, a 4°C, a cada quatro horas. A concentração da proteína após a diálise foi medida pelo método de Bradford (1976).

Para evitar a precipitação da proteína durante a diálise, foi empregado o processo de renaturação da proteína imobilizada na coluna de Ni-NTA-Agarose. Neste processo, o agente desnaturante foi removido lentamente a partir da geração de um gradiente de linear, partindo de maior concentração para menor concentração do agente desnaturante. Neste caso, a faixa de gradiente empregado foi de 8M a 1M uréia. A eluição foi feita como descrito acima.

3.1.5 Análise da purificação

Amostras da proteína purificada foram submetidas à SDS-PAGE 10% (SAMBROOK *et al.*, 2001). Após a separação eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à reação de *immunoblotting* com anticorpo anti- ϵ His (Invitrogen Co.) e anti- ADAM23 peptídeo (COSTA *et al.*, 2004; 2005).

3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

A produção de anticorpos foi realizada como descrita por Harlow & Lane (1988).

3.2.1 Imunização dos animais

Com o intuito de produzir soro policlonal específico para a proteína ADAM23, um coelho (~1,2kg) da raça neozelandesa foi imunizado com aproximadamente 500 μ g da proteína ϵ His-ADAM23 (construção 2) que foi separada por SDS-PAGE 10%. O gel foi corado com azul de Coomassie, em seguida descorado e lavado com água deionizada 2 vezes por trinta minutos. A banda correspondente a proteína recombinante foi retirada do gel e macerada em PBS (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4), totalizando um volume de 2ml. A suspensão contendo o antígeno foi inoculada no coelho em três pontos, dois pontos intramusculares e um ponto subcutâneo (HARLOW & LANE, 1988).

3.2.2 Análise da resposta imune por *immunoblotting*

A partir da terceira imunização foi coletado sangue através de punção cardíaca do coelho e com ele preparado soro. A preparação do soro consistiu em incubar o sangue coletado por 30 minutos a 37°C, então centrifugá-lo a 4000 x g por 4

minutos, coletando o sobrenadante em tubos e armazenado a -20°C. A partir do soro foram feitas análises da eficiência dos anticorpos utilizando ensaio de *immunoblotting*. Nesse método, a proteína ϵ His-ADAM23 foi submetida a um SDS-PAGE 10%, eletrotransferida para membrana de nitrocelulose e corada com PonceauS para análise da eficiência da transferência. Após o bloqueio com 5% leite sem gordura (Molico, Nestlé) em solução de TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 120 mM NaCl e 0,05% Tween 20), a membrana foi incubada por 16 horas a 4° C com o soro dos animais na diluição 1:500. A membrana foi então lavada cinco vezes com TBS-T, incubada por 1 hora á temperatura ambiente com anti-imunoglobulina de coelho conjugada com peroxidase (Pharmigen) na diluição de 1: 4000 e lavada outras cinco vezes. A reação foi evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (West Pico, PIERCE CO.) sobre a membrana, a qual foi exposta a um filme para raios-X (Kodak).

3.2.3 Análise da presença da proteína ADAM23 no encéfalo de camundongos

Extrações de proteínas totais de encéfalo de camundongos adultos, bem como frações enriquecidas de proteínas precipitadas com 30% de sulfato de amônio foram preparadas como previamente descrito (MARTINS *et al.*, 1997). Os extratos tiveram sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) e foram submetidos à reação de *immunoblotting* (item 3.2.2).

3.2.4 Análise da presença da proteína ADAM23 em diferentes linhagens celulares por imunofluorescência

As linhagens celulares de neuroblastomas utilizadas [Neuro 2-a (N2A) (código na ATCC 131), SHSY-5Y (código na ATCC CRL-2266)] foram cultivadas de acordo como descrito na ATCC (American Type Culture Collection).

As células (5×10^4 células por poço) foram semeadas sobre lâminas de vidro acopladas a câmaras de poliestireno (Lab-tek, 8 câmaras, Nunc Neogene International), previamente tratada com poli-L-lisina ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e cultivadas em meio apropriado durante 3 dias. As células foram fixadas durante 15 minutos em vapor de formol e posteriormente com paraformaldeído 2% durante 15 minutos e então lavadas com PBS. Em seguida os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-BSA 3% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-ADAM23 (diluído em PBS-BSA 3%) numa diluição de 1:50. O anticorpo primário foi deixado por 16 horas em câmara úmida a 4°C . Para retirada dos anticorpos não ligados, lavou-se as células três vezes com PBS e então, adicionou-se o anticorpo secundário (diluído em PBS-BSA 3%) anti-IgG de coelho FITC (1:800, Molecular Probes). O anticorpo secundário foi incubado durante 1 hora a temperatura ambiente e protegido da luz (câmara escura). Após a incubação com o secundário, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS. Para a marcação do núcleo das células, foi realizada a incubação com solução $3\mu\text{M}$ DAPI (4', 6-diaminidino-2-phenylindole, Invitrogen) durante dez minutos à temperatura ambiente. Após a incubação com DAPI, as células foram lavadas uma vez com água deionizada e então as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando meio apropriado de conservação (Gel Mount Aqueous, Sigma). As células foram visualizadas com microscópio óptico Nikon acoplado com sistema confocal

(BioRad) ou com microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot). Como controle destas reações, utilizou-se o soro pré-imune do animal nas mesmas diluições do soro hiper-imune.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ADAM23 E A PROTEÍNA PRÍON CELULAR

De posse dos reagentes adequados, a proteína recombinante ADAM23 e os anticorpos policlonais contra esta proteína, foi possível caracterizar a interação desta com a proteína príon celular, uma vez que já haviam as ferramentas necessárias relacionadas a proteína PrPc. Primeiramente, foram realizados ensaios bioquímicos para a verificação desta interação, então foram feitos ensaios de localização celular de ambas as proteínas e, finalmente, ensaios que puderam averiguar o possível papel biológico desta interação.

3.3.1 Método de transfecção por cálcio

Células HEK 293T (código na ATCC CRL 1573) foram transfectadas com o plasmídeo de interesse por co-precipitação de fosfato de cálcio como previamente descrito (PUSCHEL *et al.*, 1995). Brevemente, 12 µg do plasmídeo de interesse foram adicionados na superfície de 750 µl de água deionizada, seguido de 250 µl de solução 1 M CaCl₂ e 100 µl de solução 2X BBS (50 mM BES, 250 mM NaCl e 1 mM Na₂HPO₄, pH 6,95). Após cinco minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 8 ml de meio MEM (Modified Eagle's medium) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cutilab).

Uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro (TPP) contendo células HEK293T entre 60-70% de confluência, teve seu meio de cultura retirado e então,

adicionado a solução descrita acima. A placa foi incubada durante 5 horas em estufa úmida com 3% CO₂. Após este tempo, o meio foi retirado, a placa foi cuidadosamente lavada com 5 ml de PBS e adicionado novo meio MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino.

Para os ensaios de avaliação da interferência da glicosilação na interação ADAM/PrPc, foi adicionado ao novo meio o antibiótico tunicamicina (Sigma) na concentração de 0,5 mg/ ml. As células foram então incubadas em estufa úmida com 5% CO₂ durante 48 horas.

3.3.2 Ensaio de *pull-down* usando ϵ His-ADAM23 imobilizada em resina de Ni-NTA-Agarose

Após 48 horas de cultivo, as células transfectadas com pEGFP-PrPc (LEE *et al.*, 2001, ZANATA *et al.*, 2002) e pEGFP-C1 (Clontech Laboratories, Inc.) foram lisadas em PBS gelado contendo 1% de Triton X-100 e 1% de NP40 mais coquetel de inibidores de proteases (Complete-Roche) e então centrifugadas a 23000 xg durante 15 minutos a 4° C. Extratos celulares foram incubados com a proteína ϵ His-ADAM23 ligada a matriz de Ni-NTA-Agarose durante 2 h a 4° C. Após este tempo, as resinas foram lavadas 7 vezes com o tampão de lise (sem inibidores), sendo que na última lavagem foi adicionado 0,1% de SDS. O material que permaneceu ligado foi eluído com 35 μ l tampão redutor para SDS-PAGE 2,5x concentrado, fervido a 100°C durante dez minutos e submetido a SDS-PAGE 10% e analisado por *immunoblotting* usando os anticorpos anti-PrPc e anti-GFP (LEE *et al.*, 2002).

Este mesmo ensaio foi realizado usando fração 30% de extrato de encéfalos de camundongo adulto (MARTINS *et al.*, 1997) que foi incubado com a resina Ni-NTA-Agarose e com a proteína ϵ His-ADAM23 ligada à mesma resina durante 2 h a

4° C. Após as lavagens, o material ligado foi eluído sob condições desnaturantes e redutoras e foi analisado por *immunoblotting* usando o anticorpo anti-PrPc.

3.3.3 Co-imunoprecipitação das proteínas ADAM23 e PrPc usando anticorpo anti-PrPc

Após 48 horas de cultivo, as células transfectadas com pEGFP-PrPc e pcDNA3.1ADAM23-HA (CAL *et al.*, 2000) foram lisadas em tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5% de Triton X-100 e 0,2% de deoxicolato de sódio acrescido de inibidores de proteases (Complete-Roche), CaCl_2 1 mM e MgCl_2 1 mM e, então centrifugadas a 23000 xg durante 15 minutos a 4° C. Extratos celulares foram clarificados pela incubação prévia com 50 µl proteína A/G sepharose (GE Bioscience) acrescido de 20 µl de soro normal de camundongo durante 3 horas a 4° C. Após o clareamento, a suspensão foi centrifugada durante 5 min 23000 xg e metade do sobrenadante obtido foi incubado com 10 µl soro normal de camundongo e a outra metade incubado com 10 µl soro contendo anticorpos anti-PrPc durante 16 horas a 4° C. Após este tempo as soluções foram centrifugadas por 5 minutos a 23000 xg para retirada de qualquer material agregado que pudesse interferir nos resultados e então incubadas por mais duas horas com 30 µl proteína A/G sepharose, para ligação do imunocomplexo à matriz sólida. Então foram realizadas 5 lavagens com tampão de lise e o material que permaneceu ligado foi eluído com 35 µl tampão redutor para SDS-PAGE 2,5x concentrado, fervido a 100°C durante dez minutos e submetido a SDS-PAGE 10% e analisado por *immunoblotting* usando os anticorpos anti-PrPc e anti-HA (Invitrogen). O anticorpo anti-HA reconhece a etiqueta de hemaglutinina (HA) que é expressa fusionada a região carboxi terminal da molécula ADAM23 codificada pela construção pcDNA3.1 ADAM23-HA (CAL *et al.*,

2000). Este mesmo ensaio foi realizado utilizando extrato de células co-transfectadas e tratadas com tunicamicina para prevenir a glicosilação de proteínas.

3.3.4 Cultura primária de células hipocampusais de camundongo

Culturas primárias de células hipocampusais foram obtidas de cérebros de embriões (E17/18, contado dia zero o primeiro dia em que os camundongos estão juntos para acasalar) de camundongos, dissecados em solução salina balanceada de Hank's (HBSS) (Gibco-BRL) e dissociados por tripsinização (0,5 mg/ml) durante 15 minutos a 37° C. Em seguida procedeu-se com a trituração mecânica, que foi realizada com o auxílio de pipeta Pasteur, a qual teve seu diâmetro diminuído por aquecimento. Após a dissociação, a suspensão de células foi lavada 2 vezes com HBSS contendo desoxirribonuclease I (Sigma) 10 µg/ml, soro de cavalo inativado pelo calor (Cutilab) 10%, MgCl₂ 8 mM e HEPES (Sigma) 10 mM. As células foram então ressuspensas em meio Neurobasal (Gibco-BRL) contendo suplemento B-27 (Gibco-BRL), glutamina (2 mM), penicilina (100 I.U.), estreptomicina (100 µg/ml) e 5% de soro fetal bovino (apenas nas primeiras 24 horas). Um total de 10⁵ células foi semeado por poço de Lab-Tek (8 câmaras, Nunc Neogene International) que havia sido previamente tratado com Matrigel 15 µg/ml.

3.3.5 Ensaio de imunofluorescência para dupla marcação

As linhagens celulares de neuroblastomas (SH-SY5Y e N2A) e neurônios hipocampusais de camundongos foram plaqueadas em Lab-Tek de oito câmaras (NUNC). Após 48 horas de cultura as células foram fixadas e bloqueadas como descrito no item 3.2.4. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo anti-PrPc (feito em camundongo) diluído 1:100 em solução de bloqueio durante 16

horas em câmara úmida a 4° C. Para retirada dos anticorpos não ligados, lavou-se as células três vezes com PBS e então, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Texas-Red (1:800, Molecular Probes) que foi incubando durante 1 hora a temperatura ambiente e protegido da luz (câmara escura). Após este tempo, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS e foi realizado um novo bloqueio de 30 minutos com 5% BSA dissolvido em PBS. Então, foi adicionado o segundo anticorpo, anti-ADAM23 (feito em coelho), diluído 1:50 que foi incubado por três horas a temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens com PBS, e então adicionado o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado a FITC (1:800, Molecular Probes) e incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Então, prosseguiu-se a montagem da lâmina como descrito no item 3.2.4. As imagens das células marcadas foram adquiridas com microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot) ou microscópio óptico Nikon acoplado com sistema confocal (BioRad) e a sobreposição de imagens (merge) foi realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

3.3.6 Ensaio de adesão celular

O ensaio de adesão celular foi realizado como descrito por Luque *et. al.* (1994). Placas de 96 poços foram tratadas com 30 µg/mL de ϵ His-ADAM23 diluído em PBS. Após incubação de 16 horas a 4° C, os poços foram lavados para retirar a proteína não ligada e então bloqueados com 1% de BSA por 2 horas a 37° C. Células SH-SY5Y (10^5 células por poço) foram incubadas com 14 µg/ml de IgG anti-PrPc, IgG normal de camundongo ou nenhuma IgG (controle) em tampão HEPES (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2mg/mL D-glucose, pH 7,4) acrescida de cátions divalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+} na concentração de 1 mM) durante 1 hora à temperatura

ambiente. Após esta incubação, as células foram plaqueadas sobre poços previamente tratados e as placas mantidas a 37° C durante duas horas para que ocorresse a adesão. Os poços foram lavados três vezes para remoção das células não aderidas. As células que permaneceram aderidas foram coradas com azul de metileno (0,4% de azul de metileno em 30% metanol). O corante foi extraído com solvente apropriado (0,5% ácido acético, 50% metanol) e a absorbância foi mensurada à 650nm. A análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA com Turkey's *post hoc* test (GraphPad Prism software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA PROTEÍNA ADAM23

O plasmídeo pET32-*Adam23*, referente à construção 2 (contendo um fragmento de DNA codificante para o pró domínio e domínios metaloprotease e desintegrina da proteína ADAM23 murina), foi utilizado para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe BL21(DE3) de *E. coli*. Bactérias contendo o plasmídeo foram selecionadas pela resistência à ampicilina, sendo que destas colônias quatro foram escolhidas aleatoriamente, cultivadas em 10 ml de meio LB e induzidas com 0,4 mM de IPTG para expressar a proteína recombinante ϵ His-ADAM23. Para verificar se a proteína de interesse estava sendo expressa adequadamente, uma alíquota de 2 ml das culturas não induzidas e com 4 horas após a indução foi coletada, as células sedimentadas e ressuspensas em tampão de amostra. Essas amostras foram submetidas à SDS-PAGE 10% e o gel foi corado com azul de Coomassie (figura 3a). Como mostra a figura 3a, todas as colônias escolhidas apresentam o mesmo padrão de expressão para a proteína recombinante ϵ His-ADAM23.

Sabendo que todas as colônias testadas expressavam uma proteína com padrão de migração eletroforético compatível com a proteína de interesse, o passo seguinte foi verificar se a proteína estava na fração insolúvel do extrato bacteriano ou na fração solúvel através do teste de solubilidade (figura 3b), uma vez que é imprevisível saber em qual fração a proteína de interesse estará presente, sendo necessária esta informação para que se possa prosseguir com a purificação em larga escala.

No teste de solubilidade a cultura bacteriana foi primeiramente lisada em tampão de lise nativa, submetida à centrifugação para separação do material sedimentado (fração insolúvel) do sobrenadante (fração solúvel).

Para averiguar se a proteína de interesse forma agregados insolúveis, também chamados de corpos de inclusão, o sedimento proveniente da lise nativa (fração insolúvel) foi solubilizado usando um agente caotrópico, que neste caso foi usado uréia na concentração de 8M. As frações solúvel e insolúvel foram analisadas por SDS-PAGE (figura 3b).

O teste de solubilidade mostra que a proteína ϵ His-ADAM23 encontra-se na fração insolúvel do lisado bacteriano (figura 3b) sendo necessário à adição de um agente desnaturante para a purificação e obtenção da proteína solúvel recombinante.

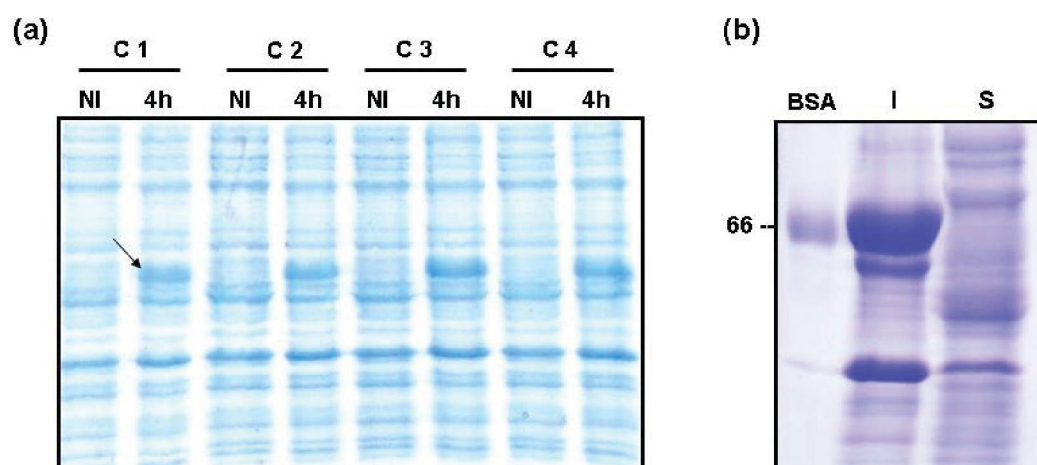


Figura 3: Padrão de expressão e solubilidade da proteína ϵ His-ADAM23 construção 2. (a) Quatro colônias foram escolhidas para a miniexpressão (C1, C2, C3 e C4) e tiveram suas amostras coletadas antes da indução (NI) e após quatro horas de indução (4h). 20 μ l de cada amostra foram submetidos à SDS-PAGE 10% e o gel corado com azul de Coomassie. Pode ser observado que todas as colônias expressaram igualmente a proteína de interesse ϵ His-ADAM23 (banda indicada pela seta). (b) Amostras da fração solúvel (S) e insolúvel (I) do lisado bacteriano foram submetidas à SDS-PAGE 10%. Este resultado mostra que a proteína recombinante está na fração insolúvel do lisado bacteriano. Foi usado como marcador de massa albumina sérica bovina (BSA).

Na tentativa de favorecer a expressão da proteína recombinante na sua forma solúvel algumas modificações foram empregadas ao protocolo original, dentre elas a diminuição da temperatura de expressão e a adição de diferentes agentes solubilizadores. No entanto, nenhuma modificação empregada foi capaz de promover a solubilização da proteína de interesse para que esta fosse purificada através da lise nativa (resultados não apresentados).

Prosseguiu-se então com a purificação em larga escala sob condições desnaturantes (tampão contendo 8 M de uréia), uma vez que a proteína de interesse encontrava-se em corpos de inclusão. O extrato resultante, após a lise e clarificação, foi incubado com resina Ni-NTA-Agarose para que a proteína portadora da cauda de seis histidinas ficasse imobilizada na resina, seguida da eluição e diálise contra PBS.

Uma amostra de cada fração eluída foi analisada por *immunoblotting* usando dois diferentes anticorpos: um anticorpo que reconhece uma etiqueta de cinco histidinas, anti-₅His (Invitrogen Co.), e outro que reconhece um peptídeo (CNNTSCLFQPRGYECRDAVNECDIT) da proteína ADAM23 humana, anti-ADAM23 peptídeo (COSTA *et al.*, 2004; 2005).

Um banda de aproximadamente 66 kDa foi reconhecida por ambos os anticorpos, confirmando assim que a proteína purificada é a proteína recombinante de interesse possuidora da etiqueta de seis histidinas (figura 4). O anticorpo anti-₅His reconheceu também produtos proveniente provavelmente da parcial degradação da proteína recombinante (bandas de menor massa molecular), que não foram reconhecidos pelo anticorpo anti-ADAM23 peptídeo.

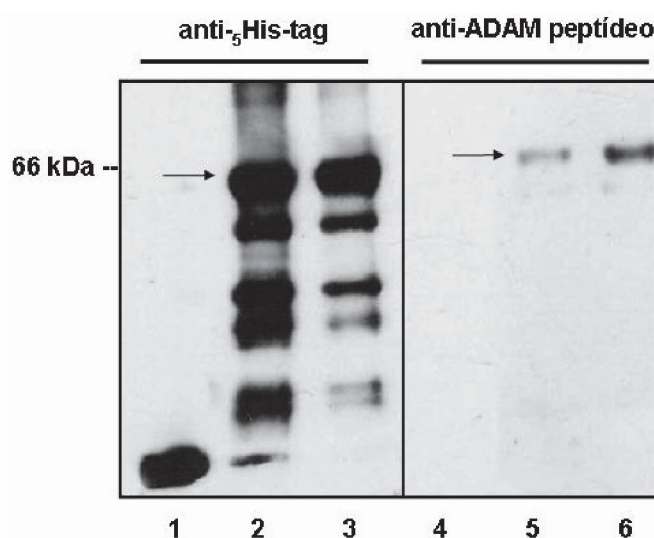


Figura 4: Análise das amostras da proteína recombinante ADAM23 (construção 2) após sua purificação por IMAC. *Immunoblotting* para detecção da proteína ADAM23 (construção 2) pelos anticorpos anti- $_{6}$ His (Invitrogen) e anti-peptídeo ADAM23 (COSTA *et al.*, 2004; 2005). Nas canaletas 2 e 3 está a proteína recombinante após a diálise (frações 1 e 2 respectivamente) e na canaleta 1 está $_{6}$ His-PrPc. Essas três amostras foram reagidas com o anticorpo anti- $_{6}$ His. Pode ser observado que este anticorpo reconhece as duas proteínas recombinantes possuidoras da etiqueta de seis histidinas e neste caso, a proteína $_{6}$ His-PrPc foi utilizada como controle positivo. No lado direito, tem-se as mesmas amostras, nas canaletas 5 e 6 está a proteína ADAM23 após a diálise (frações 2 e 1, respectivamente) e a amostra na canaleta 4 é $_{6}$ His-PrPc, sendo que todas foram reagidas com o anticorpo anti-peptídeo ADAM23, podendo ser observado que este anticorpo reconhece a proteína ADAM23 expressa e purificada, não reconhecendo a proteína $_{6}$ His-PrPc (controle negativo). Banda referente a proteína recombinante ADAM23 indicada pelas setas, as demais bandas com massa menor a 66 kDa são prováveis produtos proveniente de degradação.

Durante o processo da diálise da proteína $_{6}$ His-ADAM23, para a retirada do agente desnaturante, ocorreu a precipitação da mesma, o que levou a uma alteração nos protocolos subseqüentes. A precipitação pode ter ocorrido pela retirada drástica do agente desnaturante. Então, foi realizado um processo de renaturação da proteína imobilizada na coluna de Ni-NTA-Agarose. Neste processo, o agente desnaturante é removido lentamente a partir da geração de um gradiente de linear, partindo de maior concentração para menor concentração do agente desnaturante. Neste caso, a faixa de gradiente empregado foi de 8 M a 1M de uréia. Seguiu-se

com a eluição com 500 mM de imidazol. Mesmo assim, continuou ocorrendo a precipitação da proteína $_6\text{His}$ -ADAM23 durante a diálise.

A proteína recombinante $_6\text{His}$ ADAM23 mesmo precipitada pôde ser utilizada nas imunizações. No entanto, não era possível realizar os ensaios bioquímicos e funcionais previstos com a proteína nessas condições. Assim, optou-se pela expressão e purificação de uma outra construção da proteína ADAM23 murina. Esta construção, denominada construção 1 (vetor pET32 contendo um fragmento de DNA codificante apenas para os domínios metaloprotease e desintegrina).

O mesmo protocolo de expressão e purificação desnaturante descrito para a construção 2 foi empregado para a construção 1. Amostras das frações eluídas com imidazol foram analisadas por *immunoblotting* usando o anticorpo anti- $_5\text{His}$. Este anticorpo reconheceu uma banda na altura de aproximadamente 55 kDa (figura 5) que corresponde a massa molecular prevista para a proteína recombinante proveniente desta construção.

Através da dosagem de proteínas pelo método de Bradford, verificamos que as frações eluídas estavam numa concentração muito baixa (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Então, foi necessário fazer um monitoramento de todas as etapas da purificação para descobrir em qual delas a proteína estava se perdendo, uma vez que sua expressão estava adequada. Através do monitoramento, observamos que a maior parte da proteína recombinante obtida permanecia ligada à resina Ni-NTA-Agarose e apenas uma pequena parte era eluída (figura 6).

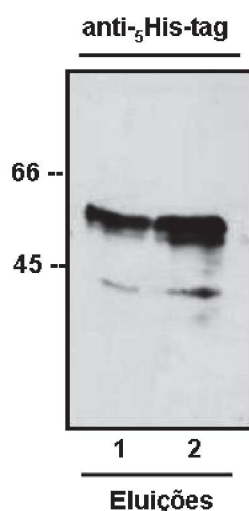


Figura 5: Análise da expressão de 6His-ADAM23 construção 1 após sua purificação por IMAC. *Immunoblotting* das frações eluídas usando o anticorpo anti- 6His . O anticorpo reconhece a proteína recombinante portadora da etiqueta de seis histidinas, e a banda está na altura esperada para a proteína recombinante proveniente desta construção com 873 pares de bases. A banda com aproximadamente 45 kDa é produto de degradação.

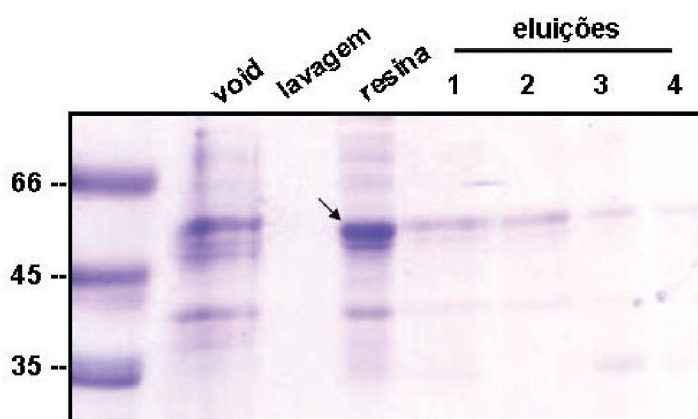


Figura 6: Monitoramento das etapas de purificação de 6His-ADAM23 construção 1. SDS-PAGE 10% corado com azul de coomassie, evidenciando as etapas de purificação. "Void" corresponde ao extrato bacteriano recuperado após incubação com a resina Ni-NTA agarose, mostrando que há proteína recombinante que não ligou na resina. A linha "lavagem" corresponde à alíquota obtida após a lavagem feita para retirada dos materiais inespecificamente ligados à resina. "Resina" corresponde à alíquota obtida da proteína recombinante que permaneceu ligada à resina mesmo após eluição com 500 mM de imidazol. 1, 2, 3 e 4 correspondem as frações eluídas. É possível observar que grande parte da proteína recombinante permanece ligada à resina. A seta indica à banda correspondente a proteína recombinante.

A proteína recombinante que permaneceu ligada à resina foi utilizada para ensaios de *pull-down* e a proteína solúvel foi suficiente para realizar os ensaios de adesão, ambos apresentados neste trabalho (ver adiante).

4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

A proteína recombinante ϵ His-ADAM23 construção 2 que precipitou foi utilizada para imunizar um coelho da raça neozelandesa. Quinze dias após a 5^a e a 7^a imunização, o sangue foi coletado através de punção cardíaca e o soro obtido após a retração do coágulo. A capacidade do soro do coelho imunizado de reconhecer a proteína ADAM23 foi avaliada por reações de *immunoblotting* e de imunocitoquímica.

A proteína recombinante ϵ His-ADAM23 (construção 2) foi submetida à reação de *immunoblotting* (figura 7a) usando o soro hiper-imune do coelho. Para testar se a proteína ADAM23 endógena de camundongo era reconhecida pelos soros, foram preparadas frações de extratos de encéfalos de camundongos adultos enriquecidas de proteínas precipitadas com 30% de sulfato de amônio. Esses extratos também foram submetidos à reação de *immunoblotting* (figura 7b) usando o soro hiper-imune do coelho.

Como pode ser observado na figura 7a, os anticorpos presentes no soro do coelho reconhecem fortemente a proteína recombinante, reação não observada quando o soro pré imune foi empregado. No ensaio usando proteínas provenientes da fração 30% de extratos de encéfalos de camundongos adultos, os anticorpos do soro hiperimune reagiram com proteínas de massa molecular aparente de

aproximadamente 90 kDa, de acordo com a massa molecular descrita por Sagane *et al.*, 1998 (figura 7b).

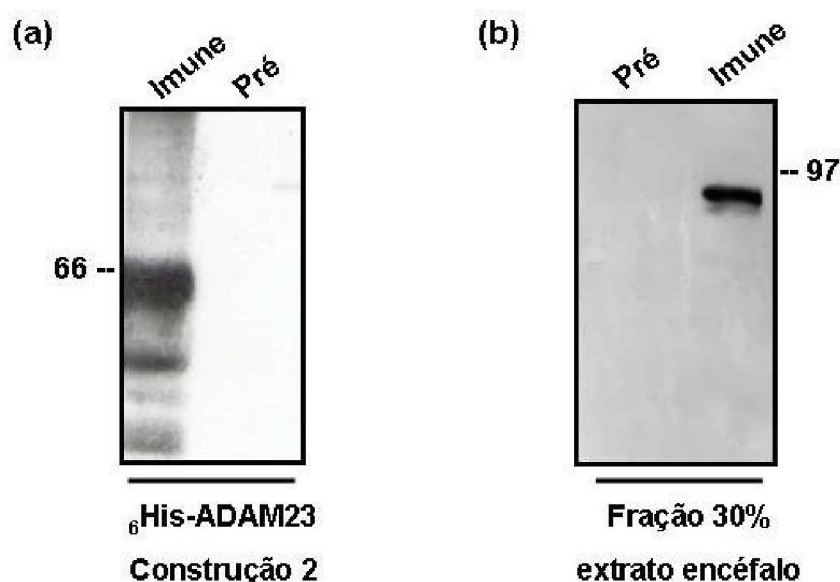


Figura 7: O soro hiper-imune reconhece a proteína ADAM23. Reação de *immunoblotting* empregando o soro policlonal anti-₆HisADAM23. **(a)** A proteína recombinante ADAM23 (construção 2) foi reconhecida fortemente pelo soro policlonal e nenhuma reação foi observada pelo soro pré-imune. **(b)** 100ug proteína/ poço de fração 30% de extrato de encéfalo de camundongo adulto foi reagido com soro policlonal e este reconheceu um antígeno com massa molecular de aproximadamente 90 kDa que corresponde a proteína ADAM23, sendo que esta banda não é reconhecida pelo soro pré-imune.

Usando linhagens celulares de origem neural, foram realizados ensaios de imunocitoquímica para a verificação da proteína ADAM23. Em ambas as linhagens utilizadas, Neuro 2A (N2A, neuroblastoma murino) e SH-SY5Y (neuroblastoma humano), a proteína ADAM23 foi identificada sendo expressa na membrana celular (figura 8). Quando foi empregado o soro pré-imune do coelho nas mesmas condições, nenhuma reação foi observada (dados não mostrados), mostrando assim a especificidade dos anticorpos presentes no soro hiper-imune.

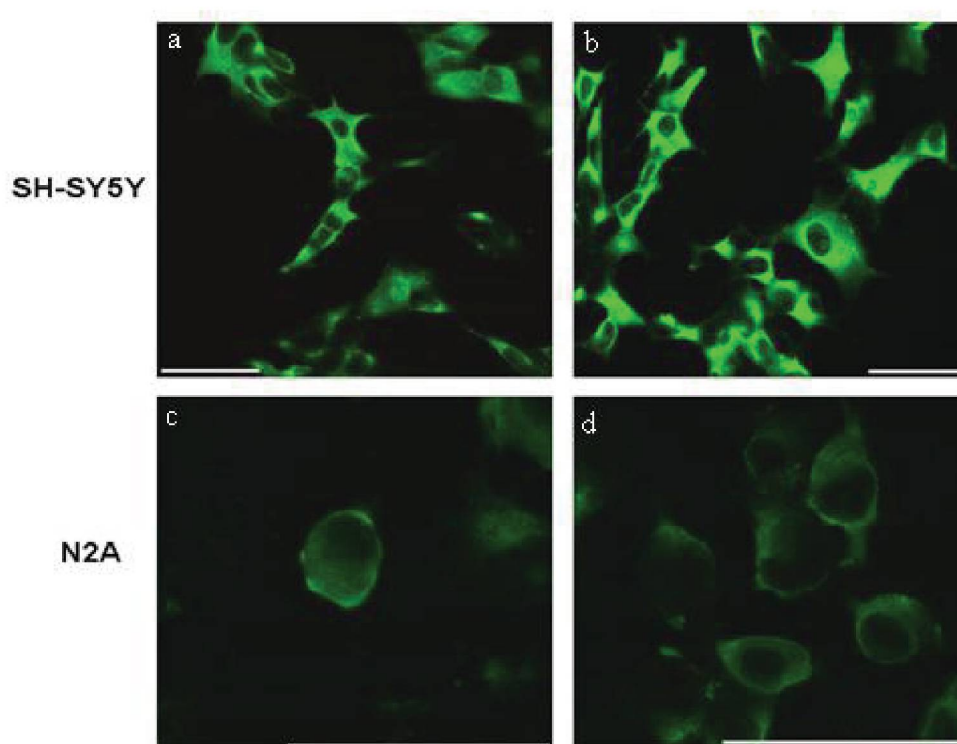


Figura 8: Anticorpos policlonais reconhecem a proteína ADAM23 presente na membrana celular. Células da linhagem SH-SY5Y (a-b) e da linhagem N2A (c-d) foram submetidas a reação de imunfluorescência empregando anticorpo anti-ADAM23 policlonal produzido em coelho (1:50, marcação em verde). A reação dos anticorpos foi evidenciada com a utilização de anticorpos anti-IgG de coelho-FITC (1:800, Molecular Probes). As células foram visualizadas com microscópio de fluorescência (a e b) ou com microscópio óptico Nikon acoplado com sistema confocal (c e d). Barra = 50 μm.

4.3 INTERAÇÃO ADAM23/PRPC

De posse das ferramentas necessárias para o estudo da interação entre a proteína ADAM23 e a proteína PrPc, iniciou-se a investigação desta possível interação.

Como descrito por Schmitt-Ulms e colaboradores (2004), as proteínas ADAM23 e PrPc estão localizadas no mesmo micro-ambiente da membrana celular, no entanto, não foi descrita nenhuma interação direta entre essas duas proteínas. Os resultados aqui descritos mostram uma interação *in vitro* e em condições padronizadas, bem como sugerem uma função biológica referente a esta interação.

Com o intuito de verificar a interação *in vitro*, extratos protéicos provenientes de células co-transfectadas com os vetores de expressão pEGFP-PrPc e pcDNA3.1 ADAM23-HA (figura 9a) foram submetidos a imunoprecipitação com o anticorpos policlonais que reconhecem a proteína príon celular. As proteínas presentes nos imunocomplexos foram eluídas da matriz sólida de proteínas A/G sepharose e analisadas por *immunoblotting* usando os anticorpos anti-HA e anti-PrPc. O resultado mostra que ADAM23-HA foi recuperada das proteínas A/G sepharose incubadas com extrato celular contendo anticorpos anti-PrPc (figura 9b, IP), reação evidenciada usando o anticorpo anti-HA que reconhece uma banda de aproximadamente 94 kDa correspondente a proteína ADAM23-HA (figura 9b, painel superior). No entanto esta reação não foi observada quando o extrato celular foi incubado com soro normal de camundongo. Esta mesma membrana foi reagida com anticorpo anti-PrPc que confirmou a presença de GFP-PrPc imunoprecipitado (banda de aproximadamente 60 kDa, fig. 9b, painel inferior) na mesma amostra em

que ADAM23-HA foi recuperada, mostrando assim que é necessário que PrPc seja imunoprecipitado para então se obter ADAM23.

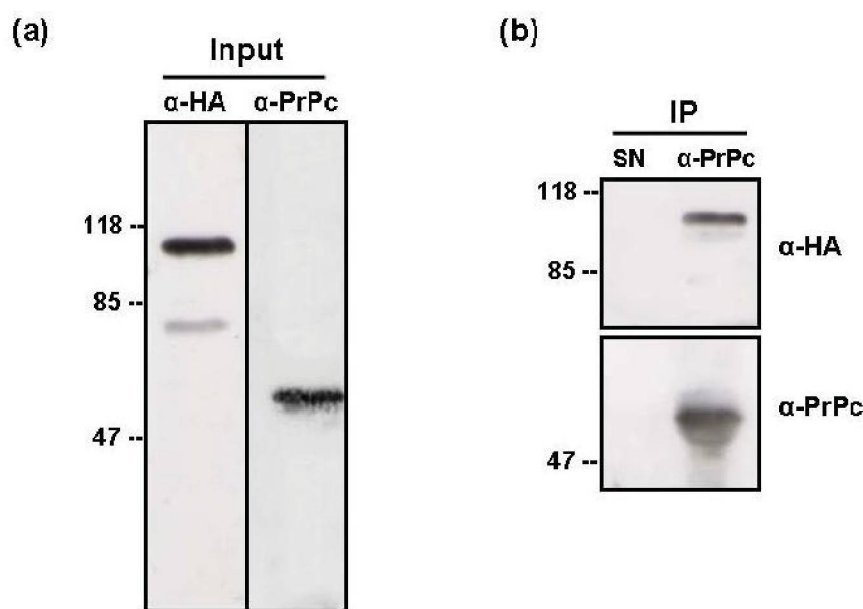


Figura 9: ADAM23 e PrPc podem ser co-imunoprecipitados. (a) Extratos de células HEK 293T co-transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP-PrPc (Input) foram separados por SDS-PAGE para verificar a eficiência da transfecção, a qual foi confirmada pela reação de *immunoblotting* (Input) usando os anticorpos anti-HA (1:1000), que reconhece uma banda de aproximadamente 94 kDa, correspondente a ADAM23-HA e anti-PrPc (1:2000) que reconhece uma banda de aproximadamente 60 kDa, correspondente a proteína GFP-PrPc. (b) O lisado celular foi submetido a reação de imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-PrPc ou soro normal de camundongo (SN, controle negativo). As proteínas imunoprecipitadas foram analisadas por *immunoblotting* com anti-HA (painel superior). A mesma membrana foi reagida com anti-PrPc (painel inferior) para confirmar que PrPc foi precipitado durante a reação.

Para confirmar esta interação *in vitro*, extratos protéicos provenientes de células transfectadas com o vetor de expressão pEGFP-PrPc e como controle, pEGFP (figura 10a), foram incubados com a proteína ADAM23 recombinante imobilizada à resina NTA-Ni-Agarose. Após muitas lavagens, o material que permaneceu ligado foi eluído e analisado por *immunoblotting* usando os anticorpos anti-PrPc e anti-GFP. A análise do *immunoblotting* mostra que apenas GFP-PrPc foi

recuperado da resina contendo ADAM23 recombinante imobilizada, detectado pelo anticorpo anti-PrPc (banda de 60 kDa) (figura 10b, painel a). Esta banda foi confirmada pela reação com o anticorpo anti-GFP (fig. 10b, painel b). Nenhuma reação foi observada quando extrato contendo GFP foi usado (figura 10b, painel c) ou quando extrato contendo GFP-PrPc foi incubado somente com a resina Ni-NTA-Agarose (dado não mostrado).

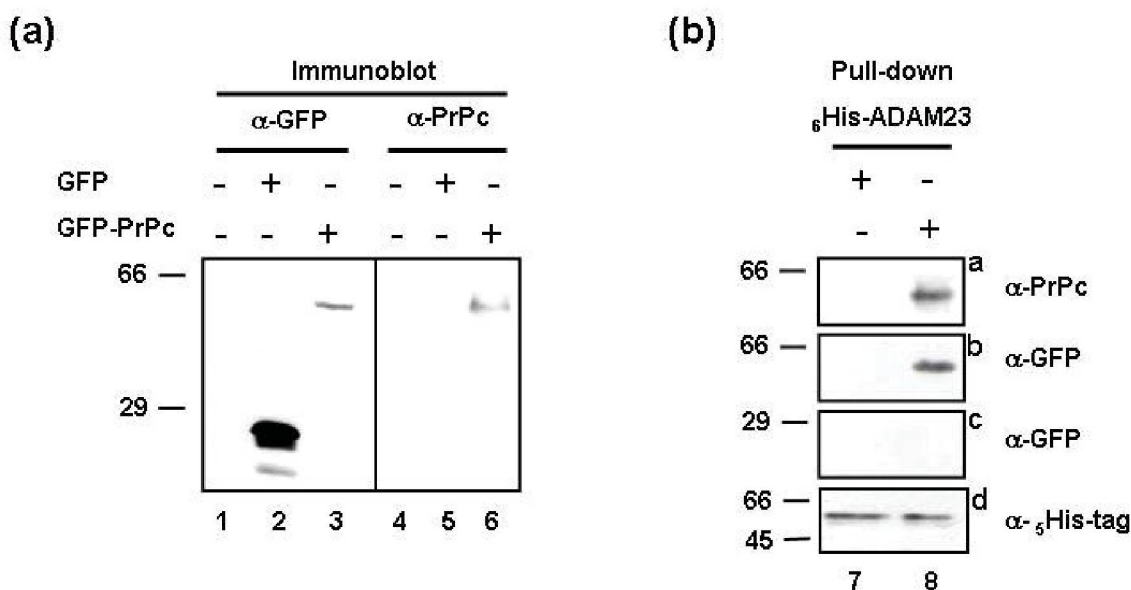


Figura 10: ADAM23 recombinante interage especificamente com PrPc recombinante proveniente de transfecção. (a) Extratos de células HEK 293T transfectadas com pEGFP-PrPc (linhas 3 e 6) e pEGFP (linhas 2 e 5) e não transfectadas (linhas 1 e 4) foram separadas por SDS-PAGE e submetidas a reação de *immunoblotting* com anticorpos anti-GFP (1:5000, linhas 1-3) e anti-rPrPc (1:2000, linhas 4-6). Observa-se que as transfecções foram eficientes e que os anticorpos empregados são específicos. (b) Extratos protéicos das células transfectadas foram submetidos a ensaios de *pull-down* com iguais quantidades de ADAM23 recombinante (painel d) imobilizadas em matriz de agarose. Após período de incubação e extensivas lavagens para retirada do material não ligado, as proteínas foram eluídas da matriz sólida com tampão de amostra e resolvidas por SDS-PAGE, seguida de reação de *immunoblotting*. Pode ser observado que apenas a químera GFP-PrPc (60 kDa) foi especificamente recuperada da matriz contendo ADAM23 (linha 8, painéis a e b), enquanto que a etiqueta de GFP (27 kDa) não foi detectada com anticorpos anti-GFP (linha 7, painel c).

Um experimento semelhante foi realizado usando PrPc presente na fração 30% de extrato de encéfalo de camundongo (figura 11, linha 3). Este extrato foi incubado com $_{6}$ His-ADAM23 ligada à resina Ni-NTA-Agarose ou somente com a resina. Após várias lavagens, o material ligado às resinas foi eluído e analisado por *immunoblotting* usando o anticorpo anti-PrPc. Esse resultado mostra que PrPc é recuperado da resina a qual está ADAM23 recombinante imobilizada (figura 11, linha 2). PrPc em menor quantidade também foi recuperado da resina Ni-NTA-Agarose limpa (figura 11, linha 1). Este dado condiz com o fato de PrPc ter afinidade à metais divalentes como já foi descrito por Brown e colaboradores (1997).

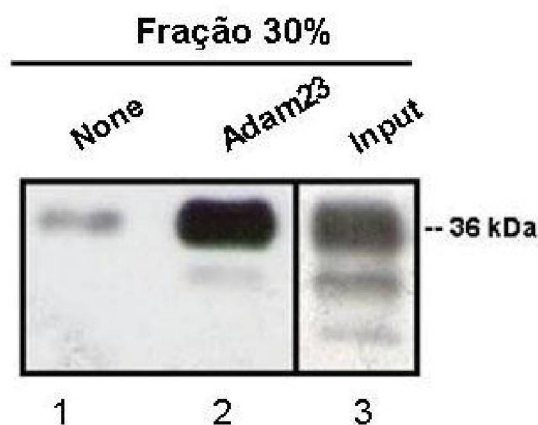


Figura 11: ADAM23 recombinante interage especificamente com PrPc proveniente do tecido nervoso murino. Fração 30% proveniente do extrato total de encéfalo de camundongo (Input, linha 3 foi incubado com $_{6}$ His-ADAM23 imobilizada na resina Ni-NTA-agarose (ADAM23, linha 2) ou somente com a resina (None, linha 1). As proteínas ligadas foram analisadas por *immunoblotting* usando o anticorpo anti-PrPc (1:2000). Observa-se que onde havia a proteína ADAM23 recombinante, a isoforma di-glicosilada de PrPc foi enriquecida. As três bandas reconhecidas no input correspondem às isoformas di-glicosilada (banda na altura de 36 kDa), mono-glicosilada (abaixo da di-glicosilada) e não glicosilada (abaixo da mono-glicosilada).

Como mostra a figura 11, principalmente a forma madura de PrPc (forma diglicosilada) foi recuperada da resina na qual havia $_6$ His-ADAM23 ligada, sugerindo que a interação ADAM23/PrPc é dependente da glicosilação de PrPc.

Para averiguar se a glicosilação de PrPc era necessária para a interação entre ADAM23 e PrPc, um ensaio de co-imunoprecipitação semelhante ao apresentado na figura 9 foi realizado. No entanto, as células co-transfectadas foram tratadas ou não com tunicamicina, que é um antibiótico que possui efeito bloqueador da formação de N-acetilglucosamina, alterando de maneira significativa o processo de glicosilação das proteínas. Assim, extrato de células tratadas e não tratadas com tunicamicina (TN) foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpos policlonais que reconhecem a proteína príon celular. As proteínas presentes nos imunocomplexos foram analisadas por *immunoblotting*.

Na análise da eficiência do bloqueio da glicosilação, pode ser observado que ambas as proteínas, ADAM23 e PrPc, são proteínas N-glicosiladas como descrito previamente (PRUSINER, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004). As proteínas em questão, provenientes de células tratadas com tunicamicina apresentam padrão de separação eletroforético diferente, quando comparado com o padrão das proteínas provenientes de células não tratadas, ocasionado pela ausência dos resíduos de açúcares. ADAM23-HA e GFP-PrPc apresentam uma massa molecular aparente menor quando são expressos por células tratadas com tunicamicina (figura 12a). Entretanto, ADAM23-HA é co-imunoprecipitada com GFP-PrPc em ambas as situações, na presença e na ausência de glicosilação (figura 12b), mostrando assim, que a glicosilação não é fator determinante para a interação entre ADAM23 e PrPc.

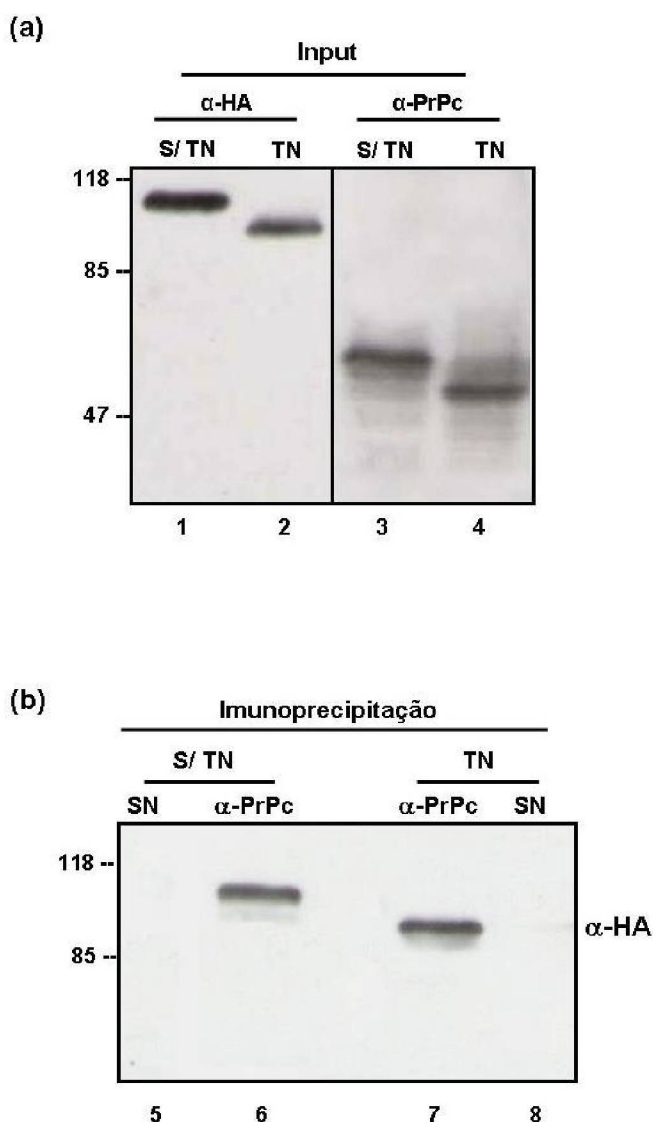


Figura 12: A interação ADAM23/PrPc é independente da glicosilação. (a) Extratos de células HEK 293T co-transfectadas com os plasmídeos de expressão pEGFP-PrPc e pcDNA3.1 ADAM23-HA, tratadas com tunicamicina (TN, linhas 2 e 4) ou não tratadas (S/TN, linhas 1 e 3) foram separados por SDS-PAGE e a eficiência do bloqueio da glicosilação foi analisado por *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-HA e anti-PrPc. Observa-se que o bloqueio foi eficiente e que ambas as proteínas sofrem N-glicosilação, uma vez que, tanto o anticorpo anti-HA reconhece uma banda menor massa molecular referente à ADAM23-HA (linha 2), quanto o anticorpo anti-PrPc que também reconhece uma banda de menor massa referente à PrPc (linha 4). (b) Os lisados celulares tratados com tunicamicina (linhas 7 e 8) ou não tratados (linhas 5 e 6) foram submetidos a reação de imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-PrPc (linhas 6 e 7) ou soro normal de camundongo (SN, linhas 5 e 8). As proteínas imunoprecipitadas foram analisadas por *immunoblotting* com o anticorpo anti-HA, o qual mostra que tanto na ausência quanto na presença de glicosilação, a proteína ADAM23-HA foi co-imunoprecipitada (linhas 6 e 7).

Ensaio de imunocitoquímica, utilizando cultura primária de neurônios hipocámpais de camundongos e a linhagem celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y e, murino, N2A, foram realizados com o intuito de analisar se as proteínas estão localizadas nas mesmas regiões da membrana celular. Como mostra a figura 13, ADAM23 e PrPc estão co-localizadas na membrana celular, o que corrobora com uma possível interação entre essas duas moléculas *in vivo*.

Sabendo que ADAM23 e PrPc interagem especificamente *in vitro* (figuras 9, 10 e 11) e que estão co-localizados na superfície celular (figura 13), surgiu o interesse de investigar o papel desta interação nos processos de adesão celular, uma vez que ADAM23 e PrPc estão envolvidas nestes processos (CAL *et al.*, 2000, GRANER *et al.*, 2000, MANGÉ *et al.*, 2002). Para isso, realizou-se o ensaio de adesão, no qual células SH-SY5Y foram cultivadas em placas de 96 poços pré tratados com 30 µg/ml de ϵ His-ADAM23. Quando comparada com a adesão sobre BSA, observa-se uma maior adesão na condição de presença da proteína recombinante ADAM23 (figura 14a). Porém esta adesão foi diminuída em 50%, quando PrPc da superfície celular destas células foi bloqueado com anticorpo anti-PrPc (figura 14b). Este efeito, entretanto, não é observado quando as células são incubadas com IgG de camundongo não imune (figura 14, b). Assim, esses dados sugerem que a interação ADAM23/PrPc participe no mecanismo de adesão celular.

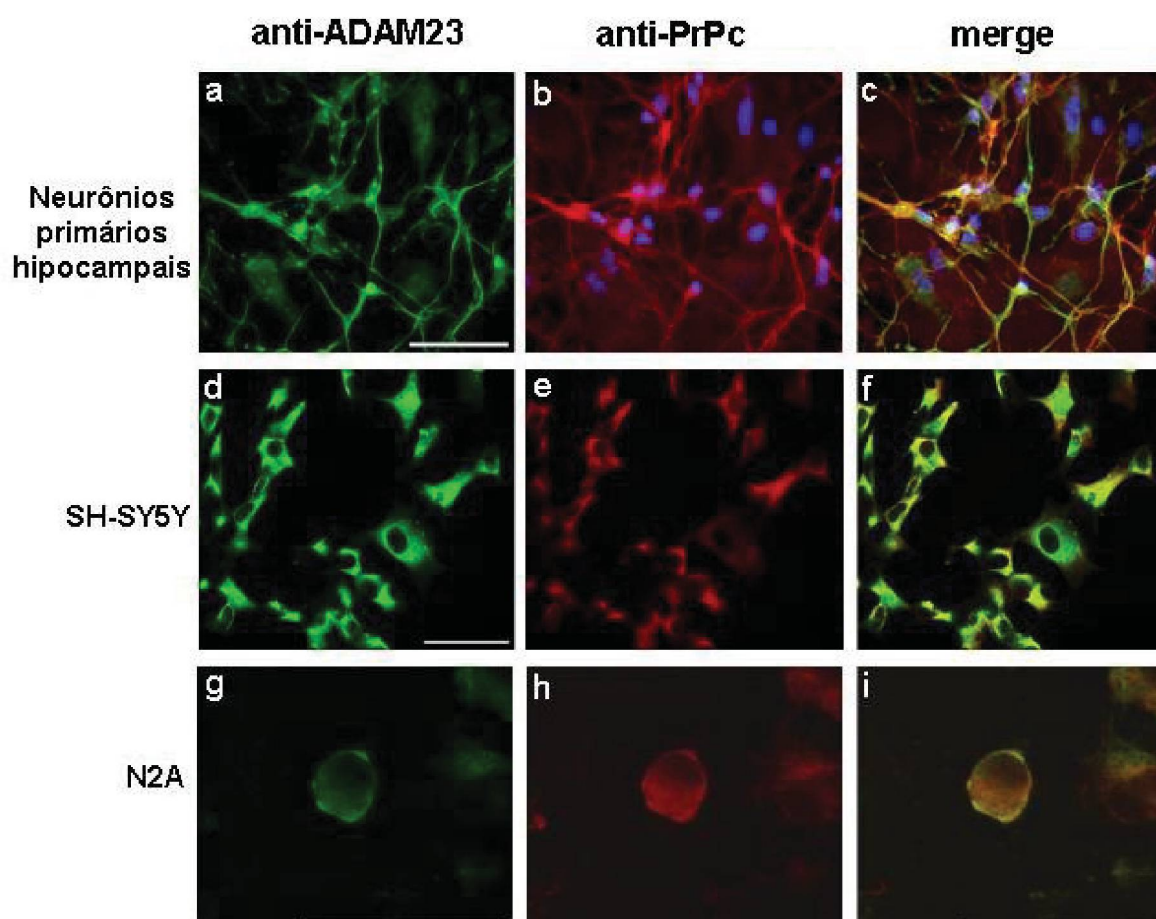
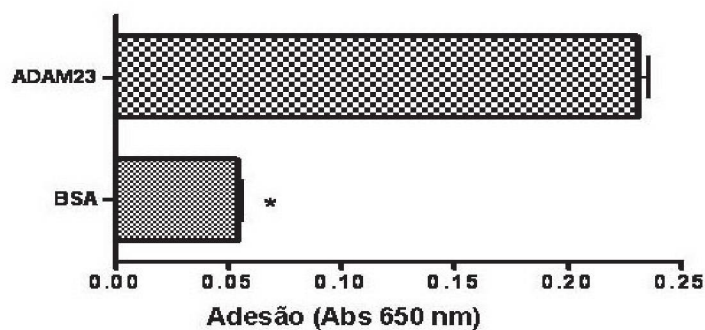


Figura 13: ADAM23 co-localiza com PrPc na membrana plasmática. Neurônios hipocâmpais de camundongos proveniente de cultura primária (a-c) e células da linhagem SH-SY5Y (d-e) e N2A (g-h) foram submetidas à reação de imunofluorescência empregando anticorpos anti-ADAM23 policlonal produzido em coelho (1:100, marcação em verde a, d e g) e anti-PrPc policlonal produzido em camundongos (1:200, marcação em vermelho b, e e h). A reação de cada um dos anticorpos foi evidenciada com a utilização de anticorpos anti-Ig de coelho-FITC (1:800, Molecular Probes) e anti-Ig de camundongo-Texas Red (1:800, Molecular Probes). As células foram visualizadas com microscópio de fluorescência (a-f) ou com microscópio óptico Nikon acoplado com sistema confocal (g-i). A sobreposição de imagens (merge) foi realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop. É possível observar pela sobreposição de imagens (merge c, f e i) que existem regiões nas quais ambas as proteínas estão sendo expressas (em amarelo). Barra = 50µm.

(a)



(b)

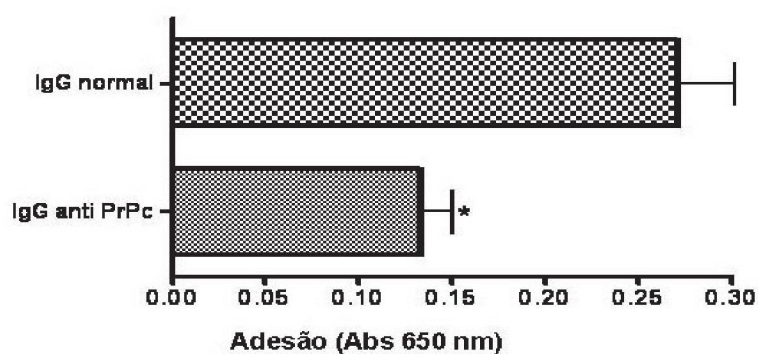


Figura 14: Células SH-SY5Y diminuem a adesão sobre ADAM23 recombinante quando PrPc de suas superfícies é bloqueado usando anticorpos. (a) Células SH-SY5Y foram semeadas em poços pré tratados com ϵ His-ADAM23 ou BSA. Observa-se um aumento na adesão das células plaqueadas sobre ADAM23 recombinante. (b) IgG anti-PrPc bloqueia a adesão mediada por ADAM23, ação que não é observada quando as células são incubadas apenas com IgG normal, mostrando que o efeito é decorrente do bloqueio do PrPc da superfície e não um artefato da IgG. *, indica $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA PROTEÍNA ADAM23

Para que fosse possível investigar a interação entre ADAM23 e PrPc, foco do presente trabalho, foi preciso produzir ferramentas que possibilitassem este estudo. Para isso, fez-se necessário a produção da proteína recombinante ADAM23, bem como a produção de anticorpos policlonais que reconhecessem a proteína ADAM23 endógena, uma vez que não existem reagentes disponíveis comercialmente.

A escolha pelo sistema pET de expressão no contexto deste trabalho deveu-se à facilidade de purificação do produto de interesse, bem como à independência da conformação da etiqueta de 6 histidinas para a ligação á resina Ni-NTA-Agarose, o que permite que a proteína de interesse seja purificada tanto em condições nativas quanto desnaturantes. Além disso, esta etiqueta é bem menor do que muitas outras, sendo pouco imunogênica e contribui muito pouco para a conformação da molécula.

A partir da inserção do fragmento de DNA que codifica o pró domínio e os domínios metaloprotease e desintegrina da ADAM23 murina no vetor de expressão pET32 (construção 2), iniciou-se a expressão e purificação da proteína recombinante ₆His-ADAM23 seguindo protocolos já estabelecidos para este tipo de vetor. A expressão da proteína ₆His-ADAM23 (construção 2) foi bem sucedida como mostra a figura 3a. Porém, a proteína de interesse forma corpos de inclusão (figura 3b), provável consequência dos altos níveis de expressão e ausência de um dobramento correto que levam a formação de agregados insolúveis (RUDOLPH & LILIE, 1996). Este fato levou a introdução de algumas modificações no protocolo original a fim de se obter a proteína na forma solúvel.

Uma modificação que pode levar à produção da proteína de interesse na sua forma solúvel é a diminuição da temperatura de crescimento e da indução. A

temperatura é uma variável deste sistema que afeta diretamente o nível de expressão e a solubilidade da proteína, logo, uma diminuição na temperatura leva a uma diminuição nos níveis de expressão, permitindo que o peptídeo tenha maior tempo de alcançar corretamente sua estrutura terciária. Mesmo com essa modificação no sistema de expressão não foi possível obter a proteína de interesse solúvel. Outros agentes solubilizadores também foram testados, mas nenhuma modificação levou à solubilização da proteína de interesse (dados não mostrados). Então, foi empregada a lise desnaturante (figura 4), a qual utiliza a uréia como agente desnaturante, capaz de solubilizar os corpos de inclusão. Este tipo de purificação não foi adequado para esta construção, pois após a diálise, para a retirada da uréia, a proteína precipitou. Mesmo utilizando a metodologia de renaturação da proteína na coluna de Ni-NTA-Agarose, na qual a proteína foi eluída num tampão contendo apenas 1 M de uréia, após a retirada do restante do agente caotrópico durante a diálise a proteína continuava precipitando. Essa proteína precipitada foi utilizada nas imunizações.

Uma vez que não foi possível obter a proteína recombinante (proveniente da construção 2) na forma solúvel, condição necessária para a realização dos ensaios bioquímicos e funcionais, resolveu-se então utilizar uma outra construção referente à proteína ADAM23.

A construção 1 apresenta apenas dois domínios da proteína ADAM23 (domínio metaloprotease e desintegrina), por isso, possui uma quantidade menor de pares de base, conseqüentemente, codifica uma proteína de massa molecular menor, o que poderia vir a favorecer a solubilidade da proteína de interesse. Novamente, ocorreu a formação de corpos de inclusão. No entanto, a utilização da lise desnaturante permitiu a obtenção de baixas quantidades da proteína de

interesse solúvel e sem precipitação após a diálise (figura 5). Foi possível obter no máximo 200 µg de proteína recombinante por litro de cultura bacteriana. Esse fato nos levou a monitorar as etapas de purificação, para saber onde que a proteína expressa estava sendo perdida. Pelo monitoramento verificou-se que grande parte da proteína expressa permanecia ligada à resina Ni-NTA-Agarose e, apenas uma quantidade pequena era eluída como mostra a figura 6. Esse resultado indica que a proteína recombinante deve estar atingindo uma estrutura terciária durante o redobramento que acaba por esconder a etiqueta de histidina não podendo ser eluída pela adição de imidazol ou, então, após a retirada do agente caotrópico ocorreu a precipitação da proteína na coluna. Interessantemente, quando não era empregada a metodologia de remodelamento da proteína ligada à coluna e, a eluição era feita sob condições desnaturantes, a proteína continuava ligada à resina. Mesmo com baixo rendimento, as purificações foram realizadas para a obtenção de ADAM23 solúvel.

Uma estratégia para a resolução de problemas associados com a formação de corpos de inclusão e redobramento de proteínas é a utilização de sistemas de expressão que utilizem proteínas de fusão. Muitas proteínas quando expressas sozinhas em *E. coli* formam corpos de inclusão, podem tornar-se solúveis quando fusionadas à outra proteína. Dentre os sistemas de fusão que podem favorecer a solubilização de proteínas em *E. coli*, estão o sistema de glutathione-S- transferase de *Schistosoma*, o sistema que emprega a proteína de ligação à maltose de *E. coli* e o sistema thioredoxina de *E.coli* (SAMBROOK *et al.*, 2001). Uma nova construção da proteína ADAM23 utilizando uma dessas proteínas pode vir a solucionar os problemas de insolubilização da mesma, facilitando trabalhos futuros.

A proteína recombinante que permaneceu imobilizada na coluna foi utilizada para os ensaios de *pull – down* e o pouco que foi purificado na forma solúvel pôde ser empregado nos ensaios de adesão celular.

5.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos policlonais produzidos pelo animal imunizado foram eficientes no reconhecimento da proteína recombinante, da proteína endógena presente no tecido nervoso de camundongos e também da proteína presente em linhagens celulares (figuras 7 e 8). No entanto, o reconhecimento da proteína endógena de camundongo foi observado por ensaio de *immunoblotting*, e neste tipo de ensaio a proteína está na sua forma desnaturada, logo os anticorpos policlonais reconhecem epítomos presentes na sequência primária da proteína.

Para saber se os anticorpos policlonais reconhecem a forma nativa de ADAM23, foram realizados ensaios de citometria de fluxo e de imunoprecipitação, os quais necessitam do reconhecimento da forma nativa da proteína pelo anticorpo. No entanto, em nenhum destes ensaios ocorreu o reconhecimento do antígeno pelos anticorpos.

Como já descrito por Harlow e Lane (1988), nem sempre anticorpos produzidos pela imunização de antígenos expressos em sistema heterólogo de *E. coli* são eficientes no reconhecimento da proteína nativa, pois proteínas na sua forma nativa apresentam epítomos conformacionais ou descontínuos.

Um anticorpo que reconheça a proteína na sua forma nativa é de grande interesse, uma vez que pode ser utilizado em diferentes metodologias para investigação da interação de ADAM23 com a proteína PrPc para corroborar com os resultados já obtidos, bem como pra estudar a adesão celular frente ao bloqueio da

proteína ADAM23 conjuntamente com PrPc. Estes ensaios poderão vir a elucidar uma possível função biológica para a interação ADAM23/PrPc.

Como é de grande interesse do nosso laboratório estudar os papéis biológicos desempenhados pela proteína ADAM23, e tanto os anticorpos policlonais quanto a proteína recombinante são ferramentas fundamentais para que possamos prosseguir com nossas investigações, investiremos na produção de novas construções para ADAM23 utilizando o vetor de expressão pGEX. Este vetor permite a expressão da proteína de interesse fusionada com glutathione-S-transferase de *Schistosoma japonicum*, e purificação através da adsorção a partículas de agarose com glutathione ligada a sua superfície. Como descrito anteriormente, este tipo de construção pode aumentar a solubilidade da proteína recombinante. A partir do produto purificado proveniente destas construções daremos continuidade às imunizações de animais a fim de se obter anticorpos policlonais adequados para nossos experimentos.

5.3 INTERAÇÃO ADAM23/ PRPC

Através de técnicas que permitem o estudo *in vivo* das interações protéicas, identificou-se diversas moléculas presente no mesmo microambiente da proteína PrPc. Uma dessas moléculas detectadas foi a proteína ADAM23 (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004). Baseados nestes resultados e em outros dados que sugerem uma interação entre PrPc e ADAM23, decidimos investigar se essa ligação poderia ocorrer *in vitro* e qual seria o seu papel fisiológico. Deve-se também mencionar que além da proteína ADAM23, nosso grupo estuda outras proteínas presentes no sistema nervoso central e PrPc é uma delas. Assim, a interação e caracterização de uma interação entre PrPc e ADAM23 tornou-se ainda mais interessante.

De acordo com o resultado mostrado na figura 9, ADAM23 pode ser co-imunoprecipitada com PrPc quando são usados anticorpos que reconhecem a proteína príon celular. Este resultado mostra que estas duas moléculas podem estar interagindo de forma direta ou indireta *in vitro*.

Ainda, usando a mesma abordagem experimental de proteínas super-expressas, GFP-PrPc expressos em células HEK 293T interagem com ϵ His-ADAM23 em condições experimentais padronizadas. Esta interação ocorre exclusivamente através de PrPc (fig.10b, painel a e b) e não pela proteína de fusão GFP, pois quando somente GFP era expresso em células 293T não ocorria tal interação (fig. 10b, painel c).

Para confirmar este resultado, empregando outra fonte de PrPc, fração protéica da precipitação com 30% de sulfato de amônio do extrato total de encéfalos de camundongos foi incubada com ϵ His-ADAM23. A figura 11 mostra que PrPc expresso em encéfalos de camundongo também interage *in vitro* com ADAM23 recombinante e, ainda, parece que esta interação ocorre preferencialmente com a forma di-glicosilada de PrPc, que é na verdade a forma madura desta proteína. Este resultado condiz com que já foi descrito na literatura de que a glicosilação de proteínas contribuem para a função destas, em última instância, na modulação de processos de interação célula-célula, célula-matriz, ligando moléculas extracelulares ou parceiros celulares (VARKI, 1993). Além disso, sabe-se que a glicosilação de PrPc é importante para manter seu correto papel biológico, uma vez que alterações na glicosilação pode gerar uma molécula de PrPc com propriedades de PrPsc (ERMONVAL *et al.*, 2003; LAWSON *et al.*, 2005).

Para averiguar se esta interação observada era dependente da glicosilação de PrPc, realizou-se um ensaio de co-imunoprecipitação usando células que super-

expressam as proteínas de interesse, com via de N-glicosilação bloqueada por tunicamicina. Como mostra a figura 12, ADAM23 pôde ser co-imunoprecipitada com PrPc independente da glicosilação de PrPc e da própria glicosilação de ADAM23, uma vez que em ambas as situações, quando células apresentavam o perfil normal de glicosilação destas proteínas ou quando este perfil estava alterado, ocorreu a interação já observada anteriormente.

Caracterizamos assim, a interação *in vitro* de ADAM23 e PrPc, interação de grande importância uma vez que, até agora apenas um parceiro molecular, a integrina $\alpha\beta 3$, havia sido descrito como ligante de ADAM23. Levando em consideração que esta ADAM não possui no seu domínio metaloprotease os aminoácidos que formam sítio ativo para a ligação de zinco (HExxHxxGxxH), o qual é crítico para a atividade proteolítica, a interação de ADAM23 com $\alpha\beta 3$ deve atuar na adesão celular (CAL *et al.*, 2000).

O papel do PrPc no mecanismo de adesão celular foi demonstrado através de sua interação com a proteína de matriz laminina (GRANER *et al.*, 2000) e também na adesão célula-célula na linhagem de neuroblastoma murino (N2A) (MANGÉ *et al.*, 2002).

Com base nestes dados da literatura referente ao papel adesivo destas duas moléculas, resolveu-se investigar a possível atuação conjunta destas duas proteínas em processos de adesão celular e assim verificar um possível papel biológico para a interação em questão. O resultado mostrado na figura 14a confirma a hipótese de que ADAM23 é uma molécula potencialmente adesiva (CAL *et al.*, 2000) uma vez que uma maior adesão foi observada em células SH-SY5Y plaqueadas sobre ADAM23 recombinante quando comparadas com células desta mesma linhagem plaqueadas sobre albumina sérica bovina. Esta adesão foi diminuída quando células

foram pré incubadas com IgG anti-PrPc e plaqueadas sobre ADAM23 recombinante, resultado que não foi observado quando as células foram pré tratadas com IgG normal (figura 14b).

Estes dados permitem inferir que a interação ADAM23/PrPc participa no mecanismo de adesão celular, mas a maneira exata de como isto ocorre ainda permanece obscura, sendo necessárias diferentes abordagens neste contexto para comprovar o envolvimento desta interação no mecanismo de adesão celular. Assim como ADAM23 parece interagir com $\alpha\beta 3$ de células adjacentes (interação em *trans*), o ensaio de adesão apresentado sugere também a interação em *trans* entre ADAM23 e PrPc. Entretanto, a possibilidade de ocorrer interação entre essas duas proteínas na mesma célula (interação em *cis*) não deve ser descartada, pois as células da linhagem SH-SY5Y usadas para este ensaio expressam ADAM23 (figura 13d), que por sua vez não foi bloqueada.

Interações em *cis* e em *trans* entre PrPc e moléculas de adesão tem sido descritas. Um exemplo, é a interação PrPc/N-CAM em neurônios hipocampais que ocorre tanto em *cis* quanto em *trans*. Estas interações são importantes para promover o recrutamento e estabilização de isoformas de N-CAM em microdomínios lipídicos específicos de membrana insolúveis em detergentes, as chamadas balsas lipídicas. Sabendo que PrPc não pode interagir diretamente com vias de sinalização intracelular, há necessidade do recrutamento de N-CAM para que esta possa ativar Fyn e então promover o crescimento de neuritos (SANTUCCIONE *et al.*, 2005).

Além das interações moleculares que mostram possíveis papéis para PrPc, devem existir interações importantes que são necessárias para o metabolismo de PrPc. Recentemente, Taylor e colaboradores (2005) propuseram a necessidade de

uma molécula que interaja e estabilize PrPc nas balsas lipídicas. Quando ocorre a ligação de cobre na região octapeptídica de PrPc, esta interação intermolecular é desfeita e PrPc é transportado para regiões de membrana não resistentes a detergentes podendo então, ser endocitado via clatrina. Dentre as moléculas encontradas juntamente com PrPc nas balsas lipídicas, ADAM23 poderia ser um possível candidato para estabilizar PrPc nessas regiões. No entanto, nossos resultados não mostram se a interação PrPc/ADAM23 é direta ou não. Ensaios que demonstrem se esta interação é direta bem como mapeamento das regiões de interação em cada molécula serão realizados para que assim possamos responder esta questão.

No que se refere ao sistema nervoso, estudos mais detalhados são necessários para que possam ser extrapolados os resultados aqui obtidos. No entanto, algumas observações sugerem que esta interação possui um papel importante no desenvolvimento e manutenção do SNC. ADAM23 e PrPc possuem uma distribuição semelhante no encéfalo (LAINÉ *et al.*, 2001, GOLDSMITH *et al.*, 2004). Animais deficientes para ADAM23 apresentam ataxia (MITCHELL *et al.*, 2001), fenótipo consistente com o fato desta proteína possuir altos níveis de expressão no cerebelo (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Esse mesmo fenótipo também é observado em animais transgênicos que expressam uma forma citosólica de PrPc, sendo que estes animais apresentam uma diminuição na camada granular do cerebelo (MA *et al.*, 2002).

Apesar de PrPc ser uma proteína bastante estudada, não há descrição do mapeamento temporal de expressão nas diferentes regiões do encéfalo, os dados descritos na literatura ainda são bastante controversos e feitos apenas no estágio adulto. Mas com relação a ADAM23, através do seu mapeamento espaço temporal,

sabe-se que os neurônios migratórios do cerebelo que saem da camada granular externa para a camada interna expressam esta proteína (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Outro fato interessante é que, esses neurônios migratórios usam como via as fibras das células de Bergmann, que por sua vez expressam a integrina αv em suas superfícies apenas durante este evento migratório (HIRSCH *et al.*, 1994). Assim, como já foi sugerido por Cal e colaboradores (2000), pode estar ocorrendo interações entre ADAM23 e $\alpha v\beta 3$ no sentido de facilitar a migração de neurônios durante o desenvolvimento.

É importante salientar que tanto a estrutura de PrPc (ancorado por GPI à membrana plasmática) como a de ADAM23 (domínio citoplasmático composto apenas por 18 resíduos) sugere que tais proteínas não apresentam elementos necessários para a transdução de sinal, sendo necessária a presença de um parceiro molecular comum para a geração deste evento. Neste contexto, poderia $\alpha v\beta 3$ ser um elemento chave para deflagrar a sinalização promovida pela interação ADAM23/PrPc.

Sendo assim, nosso grupo dará continuidade a estas investigações a fim de caracterizar um possível complexo protéico que possa atuar na adesão celular, processo de grande importância no desenvolvimento do sistema nervoso.

6 CONCLUSÕES

- ✓ As construções da proteína recombinante ADAM23 foram expressas em sistema heterólogo de *E. coli*, a partir do vetor de expressão pET32-Adam23.
- ✓ A proteína de interesse foi purificada sob condições desnaturantes, pois está presente na fração insolúvel do lisado bacteriano, mas ambas as construções apresentaram problemas no que se refere à solubilidade e rendimento.
- ✓ Os anticorpos policlonais produzidos reconhecem tanto da proteína ADAM23 recombinante, como da proteína ADAM23 endógena expressa no sistema nervoso de camundongos e em linhagens celulares.
- ✓ Os ensaios de imunoprecipitação e de *pull-down* mostraram que ADAM23 e PrPc interagem *in vitro*.
- ✓ ADAM23 e PrPc estão co-localizadas na superfície celular.
- ✓ ADAM23 recombinante promove a adesão em células SH-SY5Y e esta adesão é inibida quando PrPc da superfície destas células é bloqueado.

REFERÊNCIAS

- ALFANDARI, D.; COUSIN, H.; GAULTIER, A.; SMITH, K.; WHITE, J.M.; DARRIBÉRE, T.; DeSIMONE, D.W. *Xenopus* ADAM13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. **Current Biology**. v. 11, p. 918-930, 2001.
- ALFANDARI, D.; WOLFSBERG, T.G.; WHITE, J.M.; DESIMONE, D.W. ADAM13: A Novel ADAM Expressed in Somitic Mesoderm and Neural Crest Cells during *Xenopus laevis* Development. **Developmental Biology**, v. 182, p. 314-330, 1997.
- ANDERS, A.; GILBERT, S.; GARTEN, W.; POSTINA, R.; FAHRENHOLTZ, F. regulation of the α secretase ADAM10 its prodomain and proprotein convertase. **FASEB Journal**. v. 15, p. 1837-1839, 2001.
- ANTON, E.S.; KREIDBERG, J.A.; RACKIC, P. Distinct functions of alpha 3 and alphav integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. **Neuron**. v. 22, p. 277-289, 1999.
- BERINGUE, V.; MALLINSON, G.; KAISAR, M.; TAYEBI, M.; SATTAR, Z.; JACKSON, G.; ANSTEE, D.; COLLINGE, J.; HAWKE, S. Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. **Brain**. v. 126, p. 2065-2073, 2003.
- BIGLER, D.; TAKAHASHI, Y.; CHEN, M.S.; ALMEIDA, E.A; OSBOURNE, L.; WHITE, J.M. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM2 (fertilina beta) and murine eggs. Role of the alpha (6) integrin subunit. **The Journal of Biological Chemistry** v. 275, p. 11576-11584, 2000.
- BLOBEL, C.P. ADAMS: key components in EGFR signaling and development. **Nature**. v. 6, p. 32-42, 2005.
- BLOBEL, C.P. & WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 10, p. 654-659, 1998.
- BRACHVOGEL, B.; REICHENBERG, D.; BEYER, S.; JEHN.; MARK, K.VON DER.; BIELKE, W. Molecular cloning and expression analysis of a novel member of the Disintegrin and Metalloprotease-Domain (ADAM) family. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 288, p. 203-201, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v. 72, p. 248-54, 1976.
- BROWN, D. R. Prion and prejudice: normal protein and synapse review. **Trends in Neurosciences**. V. 24, p. 85, 2001.
- BROWN, D.R.; QIN, K.; HERMS, J.W.; MADLUNG, A.; MANSON, J.; STROME, R.; FRASER, P.E.; KRUCK, T.; BOHLEN, A.V.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; GIESE, A.; WESTAWAY, D; KRETZSCHMAR, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature**. v. 390, p. 684-687, 1997.

BÜELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H.P.; DeARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** v. 356, p. 577-582, 1992.

BUXBAUM, J.D.; LIU, K.N.; LUO, Y.; SLACK, J.L.; STOCKING, K.L.; PESCHON, J.J.; JOHNSON, R.S.; CASTNER, B.J.; CERRETI, D.P.; BLACK, R.A. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 27765-27767, 1998.

CAL, S.; FREIJE, J.M.P.; LÓPEZ, J.M.; TAKADA, Y.; LÓPEZ-OTÍN, C. ADAM23/MDC3, a Human Disintegrin that Promotes Cell Adhesion via Interaction with the $\alpha v \beta 3$ Integrin through an RGD-independent Mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1457-1469, 2000.

CERRETI, D.P.; DUBOSE, R.F.; BLACK, R.A.; NELSON, N. Isolation of Two Novel Metalloproteinase-Disintegrin (ADAM) cDNAs That Show Testis-Specific Gene Expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, p. 810-815, 1999.

CHEN, S. G.; TELOW, D. B.; PARCHI, P.; TELLER, J. K., GAMBETTI, P.; AUTILIO-GAMBETTI, L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 270, p.19173-19180, 1995.

CHESEBRO, B. Prion diseases: BSE and prions uncertainties about the agent. **Science**. v.279, p. 42-43, 1998.

CHIARINI, L.B., FREITAS, A.R.O., ZANATA, S.M., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R., LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO Journal**. v. 21, 3317-3326, 2002.

CISSÉ, M. A.; SUNYACH, C. ; LEFRANC-JULLIEN, S. ; POSTINA, R. ; VICENT, B. ; CHECLER, F. The Disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280 (49), p. 40624-40631, 2005.

COURTNEIDGE, S.A & SEALS, D.F. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins functions. **Genes & Development**, v. 17, p. 7-30, 2003.

COSTA, F. F.; COLIN, C.; SHINJO, S. M. O.; ZANATA, S. M.; MARIE, S. K. N.; SOGAYAR, M. C.; CAMARGO, A. A. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters**. v 380, p. 260-264, 2005.

COSTA, F.F.; VERBISCK, N.V.; SALIM, A.C.; IERARDI, D.F.; PIRES, L.C.; SASAHARA, R.M.; SOGAYAR, M.C.; ZANATA, S.M.; MACKAY, A.; O'HARE, M.; SOARES, F.; SIMPSON, A.J.; CAMARGO, A.A. Epigenetic silencing of the adhesion

molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, n. 7, p. 1481-1488, 2004.

CUI, T.; DANIELS, M.; WONG, B.S.; LI, R.; SY, M.; SASSOON.; BROWN, D. R. Mapping the functional domain of the prion protein. **Eur. J. Biochem.**v. 270, p. 3368-3376, 2003.

ERMONVAL, M.; MOUILLET-RICHARD, S.; CODOGNO, P.; KELLERMANN, O. ; BOTTI, J. Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. **Biochimie**. v. 85, p. 33-45, 2003.

GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S. M.; MARTINS, V. R.; JAY, D.G.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminina and mediates neuritogenesis. **Molecular Brain Research**. v.76, p. 85-92, 2000.

GIANCOTTI, F.G; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science** v. 285, p. 1028-1032, 1999.

GOLDSMITH, A. P.; GOSSAGE, S. J.; FERNCH-CONSTANT, C. ADAM23 is a Cell-Surface Glycoprotein Expressed by Central Nervous System Neurons. **Journal of Neuroscience Research**. v.78, p. 647-658, 2004.

HAJJ, G. M., LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; SILVEIRA, R.B.; SANTOS, T.G.; RIBEIRO, K.C.B.; JULIANO, M.A.; JACCHIERI, S.G.; ZANATA, S.M.; MARTINS, V.R. Integrins compensate PrPc interaction with vitronectin to support axonal growth. **Journal of Cell Science**. v. 120, p. 1915-1926, 2007

HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 1 ed. Cold Spring Harbor Laboratory: USA. 1998.

HIRSCH, E.; GULLBERG, D.; BALZAC, F.; ALTRUDA, F.;SILENGO, L.;TARONE, G. α v integrin subunit is predominantly located in nervous tissue and skeletal muscle during mouse development. **Developmental Dynamics**. v. 201, p. 108-120, 1994.

HOOPER, N.M & TURNER, A.J. Protein processing mechanisms: from angiotensin-converting enzyme to Alzheimer's disease. **Biochemical Society Transactions**. v. 28, 441-446, 2000.

HUANG, L.; FENG, L.; YANG, L.; ZHOU, W.; ZAO, S.; LI, C. Screen and identification of proteins interacting with ADAM19 cytoplasmatic tail. **Molecular Biology Reports**. v. 29, 317-323, 2002.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Essentials of Neural Science and Behavior**. Appleton & Lange, United States of America, 1995.

KÄRKKÄINEN, L.; RYBNIKOVA, E.; PELTO-HUIKKO, M.; HUOVILA, A.P. Metalloprotease-Disintegrin (ADAM) Genes are Widely and Differentially Expressed in the Adult CNS. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 547-560, .2000.

KRÄTZSCHMAR, J.; LUM, L.; BLOBEL, C.P. Metargidin. Membrane-anchored Metalloprotease-Disintegrin Protein with an RGD Integrin Binding Sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 9, p. 4593-4596, 1996.

LAFFONT-PROUST, I.; FAUCHEUX, B.A.; HÄSSIG, R.; SAZDOVITCH, V.; SIMON, S.; GRASSI, J.; HAUW, J.; MOYA, K.L.; HAÏK, S. the N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. **FEBS Letters**, v. 579, p. 6333-6337, 2005.

LAINÉ, J.; MARC, ME.; SY, MS.; AXELRAD, H. Cellular and subcellular morphological localization of prion protein in rodent cerebellum. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 47-56, 2001.

LAWSON, V.A.; COLLINS, S.J.; MASTERS, C.L.; HILL, C.L. Prion glycosylation. **Journal of Neurochemistry**, v. 93, p. 793-801, 2005.

LEE, D.C.; SUNNARBORG, S.W.; HINKLE, C.L.; MYERS, T.J.; STENVENSON, M.Y.; RUSSEL, W.E.; CASTNER, B.J.; GERHART, M.J.; PAXTON, R.J.; BLACK, R.A.; CHANG, A.; JACKSON, L.F. TACE/ ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V. 995, P. 22-38, 2003.

LEE, K.S.; MAGALHÃES, A.C.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 79-87, 2001.

LIEBER, T.; KIDD, S.; YOUNG, MW. Kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. **Genes & Development**, v. 16, p. 209-221, 2002.

LOPES, M. H.; HAJJ, G.N.M.; MURAS, A. G.; MANCINI, G. L.; CASTRO, R.M.P.S.; RIBEIRO, K. C. B.; BRENTANI, R.R.; LINDEN, R.; MARTINS, V. R. Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **The Journal of Neuroscience**, V.25 (49), p. 11330-11339, 2005.

LUQUE, A.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; CABANAS, C. Functional regulation of the human integrin VLA-1 (CD49a/CD49) by divalent cations and stimulatory β 1 antibodies. **FEBS Letters**, v. 346, p. 278-284, 1994.

MA, J.; WOLLMANN, R.; LINDQUIST, S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. **Science**, v. 298, p. 1781-1785

MANGÉ, A.; MILHAVET, O.; UMLAUF, D.; HARRIS, D.; LEHMANN, S. PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells. **FEBS Letters**, v. 514, p. 159-162, 2002.

MARTINS, V.R. AND BRENTANI, R.R. The biology of cellular prion protein. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 353-355, 2002.

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; ABREU, J.G.; SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M. & BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Medicine**. v.3, p. 1376-1382, 1997.

MILLA, M. E.; LEESNITZER, M. A.; MOSS, M. L. *et al.* Specific sequence elements are required for expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, p.30563-30570, 1999.

MITCHELL, K.J.; PINSON, K.I.; KELLY, O.G.; BRENNAN, J.; ZUPICICH, J.; SCHERTZ, P.; LEIGHTON, P.A.; GOODRICH, L.V.; LU, X.; AVERY, B.J.; TATE, P.; DILL, K.; PANGILINAN, E.; WAKENIGHT, P.; TESSIER-LAVIGNE, M. SKARNES, W.C. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics**. v.28, p. 241-249, 2001.

PESCHON, J.J.; SLACK, J.L.; REDDY, P.; STOCKING, K.L.; SUNNARBORG, S.W.; LEE, D.C.; RUSSEL, W.E.; CASTNER, B.J.; JOHNSON, R.S.; FITZNER, J.N.; BOYCE, R.W.; NELSON, N.; KOZLOSKY, C.J.; WOLFSON, M.F.; RAUCH, C.T.; CERRETI, D.P.; PAXTON, R.J.; MARCH, C.J.; BLACK, R.A. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science**. v. 282, p. 1281-1284, 1998.

POGHOSYAN, Z.; ROBBINS, S.M.; HOUSLAY, M.D.; WEBSTER, A.; MURPHY, G.; ADWARDS, D.R. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmatic domain and Src family protein-tyrosine kinases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 4999-5007, 2002.

PRUSINER, S.B.; SCOTT, M.R.; DeARMOND, S.J. & COHEN, F.E. Prion protein biology. **Cell** v. 93, p. 337-348, 1998.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 13363-13383, 1997.

PÜSCHEL, A.W.; ADAMS, R.H.; BETZ, H. Murine semaphoring D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. **Neuron**. v.14, p. 941-948, 1995.

ROESLER, R.; WALZ, R.; QUEVEDO, J.; de-PARIS, F.; ZANATA, S.M.; GRANER, E.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). **Molecular Brain Research**. v. 71, p. 349-353, 1999.

RUDOLPH, R. & LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB Journal**. v. 10 (1), p. 49-56, 1996.

RUOSLAHTI, E. The RGD story: a personal account. **Matrix Biology**. v. 22, p. 459-465, 2003.

SAGANE, K.; YAMAZAKI, K.; MIZUI, Y.; TANAKA, I. Cloning and chromosomal mapping of ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene**. v.236, p. 79-86, 1999.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MCD2 and MCD3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochemistry Journal** v.334, p. 93-98, 1998.

SAKAGUCHI, S.; KATAMINE, S.; NISHIDA, N.; MORIUCHI, R.; SHIGEMATSU, K.; SUGIMOTO, T.; NAKATAMI, A. *et al.* Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrPc gene. **Nature**. 380: 528-531, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. 2001. 3 v.

SANTUCCIONE, A., SYTNYK, V., LESHCHYNS'KA, I., SCHACHNER, M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{l^{yn}} and enhance neurite outgrowth. **The Journal of Cell Biology**. v. 169, p. 341-354, 2005.

SCHMID, R.S.; ANTON, E.S. Role of integrins in the development of the cerebral cortex. **Cerebral Cortex**. v. 13, p. 219-224, 2003.

SCHMITT-ULMS, G.; KIRK, H.; LIU, J.; COWDREY, C.; YANG, J.; DeARNOND, S.J.; COHEN, F.G.; PRUSINER, S.B.; BALDWIN, M.A. Time controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of proteins interaction in complex tissues. **Nature Biotechnology**. v. 22, p. 724-731, 2004.

SHIRAKABE, K.; WAKATSUKI, S.; KURISAKI, T. FUJISAWA-SEHARA, A. Roles of Meltrin beta/ADAM19 in processing of neuregulin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 9352-9358, 2001.

SUN, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J.; TAO, J.; WANG, C.; JING, N.; WU, C.; DENG, K.; QIAO, S. ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. **Neurochemical Research**. v. 32 (7), p. 1217-1223, 2007.

SUN, Y.P.; DENG, K.J.; WANG, F.; ZHANG, J.; HUANG, X.; QIAO, S.; ZHAO, S. (2004). Two novel isoforms of ADAM23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 325, p. 171-178, 2004.

TAYLOR, D.V.; WATT, N.T.; PERERA, W.S.S.; HOOPER, N.M. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its cooper-stimulated, clatrin-dependent endocytosis. **Journal of Cell Science**. v. 118 (21), p. 5141-5153.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of theories are correct. **Glycobiology** v. 3, p. 97-130, 1993.

VICENT, B.; PAITEL, E. SAFTIG, P.; FROBERT, Y.; HARTMANN, D.; DeSTROOPER, B.; GRASSI, J.; LOPEZ-PEREZ, E.; CHECLER, F.. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v.276 (41), p. 37743-37746, 2001.

WALZ, R.; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I.C.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I.; CAVALHEIRO, E.A.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia** v. 40, p. 1679-1682, 1999.

WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 275-278, 1995.

YANG, P.; BAKER, K.A.; HAGG, T. The ADAMs family: Coordinators of nervous system development plasticity and repair. **Progress in Neurobiology** v. 79, p. 73-94, 2006.

ZANATA, S.M., LOPES, M.H., MERCADANTE, A.F., HAJJ, G.N.M., CHIARINI, L.B., NOMIZO, R., FREITAS, A.R.O., CABRAL, A.L.B., LEE, K.S., JULIANO, M.A., OLIVEIRA, E., JACHIERI, S.G., BURLINGAME, A., HUANG, L., LINDEN, R., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **EMBO Journal**. v.21, p. 3317-3326, 2002.

ZHENG, Y.; SATTIG, P.; HARTMANN, D.; BLOBEL, C. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 42898-42906, 2004.

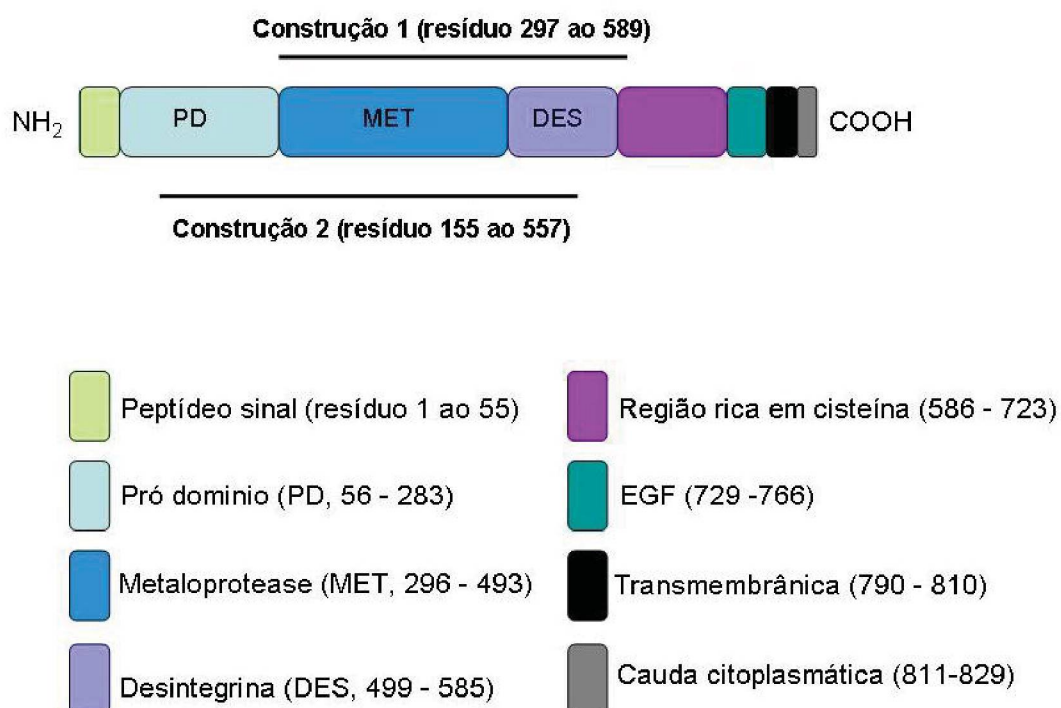
ANEXOS

ANEXO 1: Esquema da molécula ADAM23 e as regiões clonadas no vetor pET32a.....	67
---	-----------

ANEXO 2: Figura do vetor plasmidial pET32a usado na expressão de ADAM23 recombinante.....	68
--	-----------

ANEXO 1: Esquema da molécula ADAM23 e as regiões clonadas no vetor pET32a.

Figura esquemática da proteína ADAM23, mostrando o início e término de cada região da proteína. Para melhor entendimento estão indicados o início e término de cada construção usada neste trabalho para expressar a proteína ADAM23 recombinante murina.



ANEXO 2: Figura do vetor plasmidial pET32a (Novagen) usado na expressão de ADAM23 recombinante.

Figura do vetor usado para clonagem das construções de ADAM23. Destacado em vermelho as enzimas usadas na clonagem, *Hind* III e *Kpn* I.

